

**Elementspeziesanalytik von Palladium, Platin und  
Zink mittels simultaner ESI-MS und ICP-MS  
Detektion nach flüssigchromatographischer  
Trennung**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von

**Markus Hollmann**

geboren in Duisburg

Institut für Umweltanalytik

der

Universität Duisburg-Essen

**2013**

für  
Mia Sofie

To say that a man is made up of certain chemical elements is a  
satisfactory description only for those who intend to use him as  
a fertilizer.

*Hermann Joseph Muller (1890-1967) amerikanischer  
Genetiker. Nobelpreis für Medizin 1946.*

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde im Zeitraum von September 2008 bis August 2012 im Arbeitskreis von Prof. Dr. A.V. Hirner am Institut für Umweltanalytik der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Tag der Disputation: Donnerstag, den 24. Oktober 2013

Gutachter: Prof. Dr. A.V. Hirner

Prof. Dr. B. Sures

Vorsitzender: Prof. Dr. S. Schulz

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b><i>Einleitung und Aufgabenstellung</i></b>	<b>11</b>
<b>2.</b>	<b><i>Theoretischer Teil</i></b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Allgemeine Grundlagen</b>	<b>15</b>
2.1.1	Metalle und ihre Bedeutung für die (Öko-)Toxikologie, mit besonderer Berücksichtigung der Platingruppenelemente Palladium und Platin und des Zinks	15
2.1.2	Aminosäuren, Peptide und Proteine	21
2.1.3	Metallproteine: Schwerpunkt Metallothioneine	27
2.1.4	Die Zebrauschel ( <i>Dreissena Polymorpha</i> ) als Bioindikator	31
<b>2.2</b>	<b>Instrumentell-analytische Methoden zur Elementspeziesanalytik</b>	<b>33</b>
2.2.1	Elementspeziation	33
2.2.2	(Flüssig-)Chromatographie	34
2.2.2.1	Allgemeines zur Chromatographie	34
2.2.2.2	Stationäre Phasen der Flüssigchromatographie	36
2.2.3	Massenspektrometrie	40
2.2.3.1	Grundlegendes zur Massenspektrometrie	40
2.2.3.2	Flugzeitmassenspektrometrie	45
2.2.3.3	Die Orbitrap	46
2.2.3.4	ICP-MS	50
2.2.3.5	Elektrospray-Ionisation	51
2.2.3.6	Kopplungsmethoden zur Elementspeziation	54
2.2.3.7	Parallele Molekül- und Elementdetektion nach chromatographischer Trennung in der Elementspeziesanalytik	57
<b>3.</b>	<b><i>Methoden und instrumentelle Entwicklung</i></b>	<b>62</b>
<b>3.1</b>	<b>Probenvorbereitung</b>	<b>62</b>
3.1.1	Muschelernte	62
3.1.2	Extraktion individueller Muscheln zur Speziesanalytik	63
3.1.3	Mikrowellendruckaufschluss von Muschelgewebe	64
3.1.4	Mikrowellendruckaufschluss von BCR-723	65
<b>3.2</b>	<b>Spezies-Analytik</b>	<b>66</b>
3.2.1	PGE-Spezies Analytik	66
3.2.2	Zink-Analytik	68
3.2.3	Analytische Bestimmung von oxidiertem und reduzierten Glutathion	69
<b>3.3</b>	<b>Gesamtmetallanalytik</b>	<b>71</b>
3.3.1	ICP-MS basierte PGE-Analytik ohne Matrixabtrennung	71
3.3.2	Methodenevaluierung der ICP-MS basierten PGE-Analytik ohne Matrixabtrennung	72
3.3.2.1	Analyse des zertifizierten Referenzmaterials BCR-723 und von PGE-Muscheln	73
<b>3.4</b>	<b>Instrumentelles und Sonstiges</b>	<b>74</b>
3.4.1	Verwendete Großgeräte	74

3.4.2	Verwendete Chemikalien und Gase	75
3.4.3	Verwendete Laborausstattung und Verbrauchsmaterial	76
3.4.4	Verwendete Software	77
<b>3.5</b>	<b>Aufbau einer parallelen ESI-MS und ICP-MS Kopplung nach flüssigchromatographischer Trennung</b>	<b>78</b>
3.5.1	Vorüberlegungen zur Realisierung einer LC/ESI-MS/ICP-MS Kopplung	78
3.5.2	Gradientenelution bei paralleler ESI-MS und ICP-MS Detektion	85
<b>4.</b>	<b><i>Ergebnisse und Diskussion</i></b>	<b>89</b>
<b>4.1</b>	<b>Evaluierung der PGE-Analytik ohne Matrixabtrennung</b>	<b>89</b>
<b>4.2</b>	<b>Analyse des zertifizierten Referenzmaterials BCR-723 und von PGE-Muscheln</b>	<b>94</b>
<b>4.3</b>	<b>Speziesanalytik von Palladium und Platin mittels LC/ESI-MS/ICP-MS in Muschelweichgewebe</b>	<b>99</b>
<b>4.4</b>	<b>Die Rolle des Zinks bei oxidativem Stress</b>	<b>105</b>
<b>4.5</b>	<b>Metall-induzierter Oxidativer Stress und das Glutathion-Diglutathion-Redoxgleichgewicht</b>	<b>113</b>
<b>5.</b>	<b><i>Zusammenfassung und Ausblick</i></b>	<b>122</b>
<b>6.</b>	<b><i>Literatur</i></b>	<b>124</b>
<b>7.</b>	<b><i>Anhang</i></b>	<b>139</b>
<b>7.1</b>	<b>Kenndaten der Kalibrationsgeraden</b>	<b>146</b>
7.1.1	Kalibration von Pd106 auf Ho und Rh normiert als IS bis 1 ppb	146
7.1.2	Kalibration von Pd106 auf Ho und Rh normiert als IS ab 1 ppb	149
7.1.3	Kalibration von Pt195 auf Ho und Rh normiert als IS bis 1 ppb	152
7.1.4	Kalibration von Pt195 auf Ho und Rh normiert als IS ab 1 ppb	155
<b>7.2</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>159</b>
<b>7.3</b>	<b>Publikationsliste</b>	<b>162</b>
<b>7.4</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>164</b>
<b>7.5</b>	<b>Erklärung</b>	<b>164</b>
<b>7.6</b>	<b>Danksagung</b>	<b>166</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Essentielle Metalle (grün) und der prozentuale Anteil an den bekannten Metallenzymen. Für die grauhinterlegten Metalle sind keine Metallenzyme bekannt. [Entnommen aus: WALDRON et al. 2009] .....	15
Abb. 2: Bedeutung von Palladium und Platin für die US-Wirtschaft in Relation zu den übrigen PGE. Im Jahr 2011 betrug die Gesamtmenge an Importierten PGE 257 t. (Diagramm erstellt mit den Daten aus: [LOFERSKI 2011]) .....	17
Abb. 3: Die Verteilung des Zinks in der Zelle, wobei die violetten Punkte Zinkionen symbolisieren. Der Transport des Zinks erfolgt über die Zinktransporter ZIP und ZNT. Als ZIP werden diejenigen Transporter bezeichnet, die Zink in das Zytosol transportieren, während die Transporter mit der Bezeichnung ZNT Zink aus dem Zytosol entfernen. (Abbildung entnommen aus: [JOHN et al. 2010]) .....	19
Abb. 4: Die 21 proteinogenen Aminosäuren (entnommen aus .....	21
Abb. 5: Ausbildung einer Peptidbindung durch die Kondensation eines Wassermoleküls. Die Darstellung zeigt eine zwitterionische Form mit protoniertem N-terminus und deprotoniertem C-terminus (Abbildung entnommen aus: [LÖFFLER 2008]) .....	22
Abb. 6: Aufbau des Peptids $\gamma$ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycine (Glutathion) .....	23
Abb. 7: Biosynthese von Glutathion. Glutaminsäure wird unter Energieverbrauch durch $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase (GshA) an Cystein gebunden. Die anschließende Kopplung der Aminosäure Glycin unter ATP-Verbrauch durch Glutathion-Synthetase vervollständigt GSH. [COPELY & DHILLON 2002] .....	24
Abb. 8: Definition der räumlichen Struktur von Proteinen. Die Primärstruktur besteht aus der Abfolge der Aminosäuren und wird an Ribosomen erzeugt. Die übergeordneten Strukturen ergeben sich einzig aus der Aminosäuresequenz. (Abbildung entnommen aus: [NELSON et al. 2008]) .....	26
Abb. 9: Der Einfluss von Disulfidbrücken auf die Struktur von Proteinen am Beispiel des IgG. Über Schwefelbrücken werden Tertiär- und Quartärstruktur des Proteins stabilisiert. (Abbildung entnommen aus: [Online-Kompaktlexikon der Biologie 2012] .....	26
Abb. 10: Katalytischer Abbau des Superoxidradikals unter Veränderung der Oxidationsstufe des Metalls. Für M = Cu (n=1); Mn (n=2); Fe (n=2) .....	28
Abb. 11: Anzahl der Publikationen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften (peer-reviewed) zum Suchwort „Metallothionein“ in der Literaturlatenbank Scopus. Aufsummiert ergibt sich eine Zahl von 12900 Publikationen (Stand November 2012). .....	29
Abb. 12: Anhaftende Dreikantmuscheln auf einem Stein. (Gefunden und fotografiert bei der Muschelernte in Haltern, NRW) .....	31
Abb. 13: Die Atmung der Muschel führt zur Akkumulation von Xenobiotika und Metallen im Muschelweichgewebe. (Abbildung entnommen aus: [NORDSIECK ET AL. 2012]) .....	32
Abb. 14: van-Deemter-Gleichung [Zuern 2007] .....	35
Abb. 15: Oberflächenbeschaffenheit von C18-Säule (links) und einer Säule bestehend aus PGC (rechts) entnommen aus [THERMO SCIENTIFIC CORPORATION 2004b]. .....	37
Abb. 16: <i>links</i> : Darstellung der Wechselwirkungen des LUMO mit dem $\pi$ -Elektronensystem des Graphits. a) hohe Wechselwirkung bei planaren Molekülen. b) geringe Wechselwirkung bei nicht-planaren Molekülen. <i>rechts</i> : Retention beruhend auf einem induzierten Dipol aufgrund einer positiven Ladung (c) oder einer negativen Ladung (d) (Abb. entnommen aus [THERMO SCIENTIFIC 2009]) .....	38
Abb. 17 Oberfläche einer PFP-Säule (Abb. entnommen aus [THERMO SCIENTIFIC 2009]) .....	38
Abb. 18: Prinzip einer SEC-Säule. Die Säule ist befüllt mit porösen spärlichen Polymerpartikeln. Kleine Moleküle dringen tiefer in die Poren ein und eluieren dadurch später als große Moleküle. (entnommen aus [SCHWEDT 2008]) .....	39
Abb. 19: Prinzipieller dreistufiger Aufbau eines Massenspektrometers .....	42
Abb. 20: Aufbau eines Quadrupolmassenfilters [LOTTSPICH & ENGELS 2006] .....	43
Abb. 21: Schematischer Aufbau eines Quadrupolflugzeitmassenspektrometers. Die Ionen werden durch die Ionenoptik geleitet und fokussiert (Q0). Im Quadrupol Q1 können einzelne m/z-Werte selektiert oder alle Ionen durchgeleitet werden. Der darauf folgende Q2 kann mit einem Kollisionsgas (Argon, Stickstoff) befüllt werden und zur Fragmentation (CID, von engl. „collision-induced-dissociation“) der in Q1 selektierten Ionen genutzt	

werden. Anschließend werden die Ionen vom Pusher paketweise ins Flugrohr überführt und ggf. an einem Reflektor zur Verlängerung der Driftstrecke reflektiert. Schließlich werden die einzelnen Ionen an einem Detektor registriert. (Abbildung entnommen aus [LOTTSPREICH & ENGELS 2006]) .....	45
Abb. 22: Aufbau und Funktionsweise des Orbitrap-Massenanalysators (Abbildung zur Verfügung gestellt von: Thermo Scientific) .....	48
Abb. 23: Transient von Insulin in einer Orbitrap-Ionenfalle. Die Differenz zwischen den Ausschlägen entspricht der Dauer für eine Oszillationsbewegung des Ions. (Abbildung entnommen aus: [HU et al. 2005]) .....	49
Abb. 24: Fouriertransformiertes Signal von Insulin. Die roten Spektren stellen das berechnete Isotopenmuster dar, während die schwarzen Spektren eine Vergrößerung des jeweiligen Ladungszustands zeigen. Aufgenommen wurden 8 Mio Datenpunkte. (Abbildung entnommen aus: [HU et al. 2005]) .....	49
Abb. 25: Aufbau eines ICP-MS: (1) Probenstellfläche, (2) Sprühkammer, (3) Torch & RF-Spule, (4) Shield-Torch-System (STS), (5) Interface & Ionenlinsen, (6) Masseflussregler, (7) Oktopol-Reaktionssystem, (8) Hochvakuumbereich mit Quadrupol als Massenanalysator, (9) Detektor (Abbildung zur Verfügung gestellt von Agilent Technologies) .....	50
Abb. 26: Bildliche Darstellung des Ionenemissionsmodells. Die Abstände zwischen den positiven Ladungen (+) verringern sich bei kleiner werdenden Tröpfchenradius. Die Moleküle (hellgrau) im Umfeld der Ladungen übernehmen diese bei einer Emission der Ionen bedingt durch Ladungsabstoßung (entnommen aus [LOTTSPREICH & ENGELS 2006]) .....	52
Abb. 27: Charakteristischer „Briefumschlag“ bei der Elektrospray-Ionisierung des Proteins Cytochrome C. Es wurde eine 10 µM-Proteinlösung in Methanol/Wasser (1:1, v/v) per Fließinjektion aufgegeben. ....	53
Abb. 28: Schematische Darstellung diverser Kopplungstechniken, die sich in dieser Kombination zur Elementspeziesanalytik eignen (vgl. Cammann 2001) .....	54
Abb. 29: Bedeutung des ESI-MS für die Elementspeziation. Die Anzahl der Publikationen wurde aus der Literaturlatenbank „Scopus“ mit dem Suchwörtern „elemental speciation ESI-MS“ ermittelt. ....	55
Abb. 30: Einfluss der mobilen Phase auf die positive Elektrospray Ionisierung. Ideal sind mobile Phasen, die neben einem organischen Anteil auch eine schwache Säure beinhalten. (Abbildung entnommen aus [THERMO SCIENTIFIC CORPORATION 2004a]) .....	59
Abb. 31: Analytik Jena SpeedMill (links) und der zugehörige Lysis-Tube mit Keramikugeln befüllt (rechts)..	63
Abb. 32: Chromatogramm in FullScan-Modus (oben), typisches „Envelope“-Massenspektrum eines Biopolymers bei $t_R$ 6,69 min (unten). Die Massenauflösung des Geräts betrug $R = 50000$ . ....	80
Abb. 33: Das 16-fach geladene Cytochrom C - Ion zeigt, dass eine Auflösung von $R = 50000$ zu annähernder Isotopenauflösung hinreichend ist. Die Dekonvolution der Ladungszustände generiert eine experimentelle monoisotopische Masse für Cytochrom C von 12351,35029 Da. ....	81
Abb. 34: Technische Realisierung des Flussteilers (oben), schematischer Aufbau (unten) .....	82
Abb. 35: Aufbau der LC/ESI-MS/ICP-MS online-Kopplung .....	83
Abb. 36: ESI- TIC, extracted Ion Chromatogramm von $m/z=198$ und die Selen ICP-MS Spur in Korrelation. ..	84
Abb. 37: Ermitteltes (oben) und berechnetes (unten) Massenspektrum von SeMet. Die Berechnung erfolgte für eine Auflösung von 56000 FWHM .....	85
Abb. 38: Ionisierungseffizienz einer 10 ppb Standardlösung Rhodium in Abhängigkeit eines Methanol-Gradienten. Mit steigendem organischem Laufmittelanteil verringert sich die Signalstärke des Rhodiums. (Abbildung nach Anwendung des Savitzky-Golay Algorithmus) .....	86
Abb. 39: Aufbau von Sprühkammer und Membrandesolvator zur Erhöhung der Matrixtoleranz des ICP-MS. ..	87
Abb. 40: Aufbau der LC/ESI-MS/ICP-MS online-Kopplung inklusive Membrandesolvator zur Erhöhung der Matrixtoleranz organischer Laufmittelzusammensetzungen. ....	88
Abb. 41: Ionisierungseffizienz einer 10 ppb Standardlösung Rhodium in Abhängigkeit eines Methanol-Gradienten. Die Signalstärke des Rhodiums kann als konstant betrachtet werden. (Abbildung nach Anwendung des Savitzky-Golay Algorithmus) .....	88
Abb. 42: Zählratenverhältnis von Palladium und Rhodium bei verschiedenen Störionenkonzentrationen. ....	90
Abb. 43: Zählratenverhältnis von Platin und Rhodium bei verschiedenen Störionenkonzentrationen. ....	92

Abb. 44: Einfluss der Störionen bei Membrandesolvatisierung ohne Verwendung der Kollisionszelle für Palladium ( <i>oben</i> ) und Platin ( <i>unten</i> ).	93
Abb. 45: Exemplarische Daten für die zeitabhängige Aufnahme von Pd durch die Dreikantmuschel	96
Abb. 46: Exemplarische Daten für die zeitabhängige Aufnahme von Pd durch die Dreikantmuschel	97
Abb. 47: Die Pt-Verteilung in einer Dreikantmuschel liegt bei Intensitäten von 3E6-Counts (Abbildung zur Verfügung gestellt von David Riesop)	98
Abb. 48: Die Pd-Verteilung in einer Dreikantmuschel liegt bei Intensitäten von 1E6-Counts (Abbildung zur Verfügung gestellt von David Riesop)	98
Abb. 49: Korrelation des ESI TICs ( <i>oben</i> ) mit der Platin-Spur des ICP-MS ( <i>unten</i> ) eines Dreikantmuschel Gewebeextrakts gegen Platin exponierter Individuen.	100
Abb. 50: Vergleich des Palladium- ( <i>oben</i> ) und des Platinelutionsprofils ( <i>unten</i> ) in der ICP-MS nach SEC.	101
Abb. 51: Vergleich des Palladium- ( <i>oben</i> ) und des Platinelutionsprofils ( <i>unten</i> ) in der ESI-MS nach SEC.	102
Abb. 52: Korrelation des ESI TICs ( <i>oben</i> ) mit der Palladium-Spur des ICP-MS ( <i>unten</i> ) eines Dreikantmuschel Gewebeextrakts gegen Palladium exponierter Individuen.	102
Abb. 53: IR-Schwingungsspektren von Glutathion (schwarz) und eines potentiellen Glutathion-Zink-Komplexes. Die Stöchiometrie bei der Reaktion zeigt keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der Verbindung. Das rote Spektrum (Zn-GSH-Verhältnis 1:1) weist gegenüber dem grünen Spektrum (Zn-GSH-Verhältnis 1:2) keine signifikante Veränderung auf. Ebenso kann eine S-H-Valenzschwingung nur im „freien“ Glutathion beobachtet werden (markiert durch den Kreis).	106
Abb. 54: Massenspektrum von ZnGSH ( <i>unten</i> ) im Vergleich zum berechneten Isotopenmusters eines $C_{10}H_{15}N_3O_6SZn$ -Komplexes ( <i>oben</i> )	107
Abb. 55: Strukturvorschlag für ZnGSH	107
Abb. 56: $MS^2$ von ZnGSH führt zum Verlust des Glutaminsäurerests mit einer Masse von 129,04 ( <i>unten</i> ). Eine weitere Fragmentierung ( $MS^3$ ) des erhaltenen Ions liefert ein Zink-haltiges Oxazolidinon-Derivat mit einer Masse von 137,83 ( <i>oben</i> ).	108
Abb. 57: Vorschlag eines Fragmentationsmechanismus für ZnGSH hervorgerufen in einem Massenspektrometer durch kollisionsinduzierte Dissoziation (CID). Die Darstellung von Ladungen und Radikalen erfolgt zum besseren Verständnis. Eine definitive Lokalisierung ist in der Massenspektrometrie nicht möglich.	109
Abb. 58: Postulierte Zinkglutathion-Struktur von Krężel und Bal. Das W symbolisiert ein Wassermolekül (entnommen aus [KRĘŻEL & BAL 2004]).	110
Abb. 59: Gegen verschiedene Zn/GSH-Systeme exponierte Plasmid-DNA. Die Zugabe von Glutathion verringert das Auftreten von Zink-induzierten Strangbrüchen.	111
Abb. 60: Endothelzellen in Zellkulturmedium (Dulbecco's Minimal Essential Medium, DMEM) exponiert gegen Zink weisen eine deutlich stärkere Mortalität auf eine Kontrollgruppe, der reduziertes Glutathion zum Medium zugefügt wurde. (Abbildung entnommen aus: [WISEMAN et al. 2010]).	112
Abb. 61: ESI-qTOF-MS Massenspuren bei $m/z = 308$ (GSH, <i>oben</i> ) und $m/z=613$ (GSSG, <i>unten</i> )	113
Abb. 62: Massenspektren von GSH ( <i>oben</i> ) und GSSG ( <i>unten</i> ) im Vergleich zu theoretisch berechneten Massenspektren der Verbindungen.	114
Abb. 63: Regressionsgerade für Glutathion. In blau eingezeichnet ist das 95%-Vertrauensintervall der Geraden.	115
Abb. 64: Regressionsgerade für GSSG. In blau eingezeichnet ist das 95%-Vertrauensintervall der Geraden.	116
Abb. 65: Ermittlung der GSH-Konzentration im Standardadditionsverfahren. Am Schnittpunkt mit der Abszisse kann die GSH-Konzentration von 0,17 mmol/L abgelesen werden.	118
Abb. 66: Ermittlung der GSSG-Konzentration im Standardadditionsverfahren. Am Schnittpunkt mit der Abszisse kann die GSSG-Konzentration von 0,30 mmol/L abgelesen werden.	119
Abb. 67: SeMet Übersichtsspektrum	139
Abb. 68: Geographische Lage des Muschelernteplatzes an der Stever zwischen Halterner Stausee und Hullener Stausee im südlichen Münsterland [Karte aus GoogleMaps]	139



Abb. 69: Glovebox zur Vermeidung von Oxidationen bei der Probenvorbereitung. Die Glovebox wurde in Anlehnung kommerziell erhältlicher Modelle entworfen und von den Werkstätten der Universität Duisburg-Essen gefertigt.....	140
Abb. 70: SpeedMill zum Aufschluss des Gewebes.....	140
Abb. 71: LysisTube zum Aufschluss von Gewebe. Im inneren des Gefäßes befinden sich Keramikugeln, die mechanisch das Gewebe verkleinern .....	141
Abb. 72: Anschluss der Desolvatisierungseinheit an die Plasmafackel des ICP-MS (oben) und Komplettansicht der Kopplungsapparatur bestehend aus HPLC, ESI-MS und ICP-MS (unten) .....	142
Abb. 73: Analysenzertifikat des zertifizierten Referenzmaterials BCR - 723.....	158

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifizierung der Lewis-Säuren und –Basen nach Pearson (Auszug aus [PEARSON 1968]).....	16
Tabelle 2: Übersicht über die Änderung des Zinklevels bei verschiedenen Tumorarten (Vgl. Tabelle 3 in [JOHN et al. 2010]) .....	20
Tabelle 3: Übersicht über die Klassifikation der Metallothioneine. Übersetzt aus dem Englischen [THIRUMOORTHY et al. 2011] .....	30
Tabelle 4: Exemplarische Auswahl von Erkrankungen, die mit Metallothioneinen in Verbindung stehen .....	30
Tabelle 5: Charakteristische Massenauflösungen verschiedener massenspektrometrischer Methoden .....	44
Tabelle 6: Übersicht über Kopplungsmethoden und ihre typischen Anwendungsbereiche .....	55
Tabelle 7: Aufschlussprogramm der Mikrowelle für Muschelgewebe .....	64
Tabelle 8: Bedingungen des Mikrowellenaufschlusses für das Referenzmaterial BCR-723 .....	65
Tabelle 9: Übersicht der verwendeten ICP-MS und ESI-MS Parameter .....	67
Tabelle 10: Pipettierschema des Plasmid-Assays .....	69
Tabelle 11: GSH und GSSG-Konzentrationen.....	70
Tabelle 12: Isobare und polyatomare Interferenzen auf Palladium und Platin in der ICP-MS mit Relevanz für die Umweltanalytik.....	71
Tabelle 13: Konzentrationen der Analytlösung (Pd, Pt), des internen Standards (Rh, Au) und der Störionen für Palladium und Platin (Sr, Y, Zr, Cd, Hf, Hg).....	72
Tabelle 14: Kalibrationsreihe gemessen vor den Proben (links) und nach den Proben (rechts) .....	73
Tabelle 15: Messreihenfolge der Palladium- und Platin-Bestimmung.....	74
Tabelle 16: Verwendete Chemikalien .....	75
Tabelle 17: Verwendete Gase .....	76
Tabelle 18: Verwendete Laborausstattung und Verbrauchsmaterial.....	76
Tabelle 19: Eigenschaften der verschiedenen Massenspektrometertypen (zusammengestellt aus den Spezifikationen der Hersteller) .....	80
Tabelle 20: Nachweis- und Bestimmungsgrenze von Pd und Pt bei der Gesamtmetallbestimmung .....	94
Tabelle 21: Ergebnisse der Gesamtmetallanalyse von Pd und Pt (ausführliche Daten siehe Anhang) .....	95
Tabelle 22: Vergleich der gemessenen Werte des zertifizierten Referenzmaterials BCR-723 mit den zertifizierten Angaben .....	95
Tabelle 23: Mögliche Zuordnung der Platin-bindenden Proteine .....	101
Tabelle 24: Zuordnung möglicher Palladium-Proteinspezies mit Hilfe der UniProt-Datenbank.....	103
Tabelle 25: Mittelwerte der Flächenintegrale von GSH und GSSG mit relativer Standardabweichung aus einer Dreifachbestimmung.....	115
Tabelle 26: Analytische Kennzahlen und Grenzwerte für die entwickelte Methode zur Bestimmung von oxidiertem und reduziertem Glutathion .....	117
Tabelle 27: Absolutmengen der analytischen Grenzwerte zur GSH und GSSG-Bestimmung .....	117
Tabelle 28: Vergleich der bestimmten Werte für GSH und GSSG mit Werten aus der Literatur [ROSSI et al. 2002] .....	119

## 1. Einleitung und Aufgabenstellung

Metalle, sowie Metallverbindungen und –komplexe spielen eine wichtige Rolle in Physiologie, Biochemie und Umwelt. Für die Bewertung der Folgen auf die Umwelt nach Exposition eines Metalls sollte man neben der absoluten Menge des Metalls auch dessen chemische Form – die Metallspezies - kennen.

Dadurch können u.a. Aussagen über Mobilität in beispielsweise Gewässern oder auch über die Fähigkeit zum (Membran-)Transport in potentiell exponierten Organismen getroffen werden. Somit ist Abschätzung der Toxizität sinnvoll möglich.

Ebenso ist eine Bestimmung der chemischen Form eines Metalls zur Aufklärung verschiedener Vorgänge in lebenden Organismen nötig. Zum einen laufen viele enzymatische Reaktionen direkt (als aktives Zentrum) oder indirekt (als strukturgebendes Element) katalysiert durch eine Metall ab und zum anderen können Metalle an der Entstehung schädlicher Prozesse beteiligt sein. Neben der Entstehung von Krankheiten in Verbindung mit einem Ungleichgewicht im Metallhaushalt des Organismus sind adverse Effekte auch durch Metall-induzierten oxidativen Stress oder Enzymblockage denkbar.

Bei erstgenanntem wird oftmals eine Verschiebung des Gleichgewichtszustands eines Metalls innerhalb eines Organismus beobachtet. Beispielsweise führt eine Veränderung des Zinklevels zu einer Verminderung der Wundheilung oder steht eine Störung des Zinktransportmechanismus in Verbindung mit Brustkrebs. Auch essentielle Vorgänge für die Zelle, wie das Eliminieren von oxidativem Stress (Katalase, SOD), oder der programmierte Zelltod (*p53*) basieren auf Zinkproteinen und –peptiden.

Glutathion (GSH) ist das häufigste vorkommende Biothiol in Zellen und Plasma. Neben der hohen Affinität zu Zink und anderen (Schwer-)Metallen und der dadurch bedingten wichtigen Rolle in der Metalletoxifizierung von lebenden Organismen dient GSH als Radikalfänger in den Zellen und verhindert

durch die Ausbildung der schwefelverbrückten dimeren Form GSSG die Oxidation von intrazellulären Enzymen oder der Zell-DNA.

Krankheiten und auch durch Exposition aufgenommene Metalle können diese Mechanismen stören. Für den Menschen ist die Aufnahme eines Metalls z.B. im Rahmen einer beruflichen Tätigkeit oder über die Nahrung möglich. Besonders aquatische Organismen wie Fische oder Weichtiere neigen zur Akkumulation von Metallen und Metallspezies im Gewebe, so dass zusätzlich zu den Einflüssen der Metallspezies auf die tierischen Lebensformen auch ein Eintrag in die Nahrungskette des Menschen denkbar ist. In der Regel sind diese Metalle anthropogenen Ursprungs. In der Minamata-Bucht (Japan) wurden Methylquecksilber-haltige Abwässer ins Meer geleitet, so dass dieses über den Fischkonsum von den Menschen aufgenommen wurde und zu neurologischen Störungen bis hin zum Tod führte.

In den Ballungsräumen in Mitteleuropa ist dahingegen der Eintrag von Feinstäuben ein möglicher Weg von Schwermetallen in die Umwelt. Neben Bremsabrieb kann insbesondere das Einbringen von Platingruppenelementen aus Autokatalysatoren nachgewiesen werden. Berücksichtigt man die Tatsache, dass auf Platin und Palladium basierte Medikamente als Zytostatikum in der Krebstherapie eingesetzt werden und diese durch Punktmutationen der DNA und Veränderung des Proteoms zum Zelltod führen, dann ist eine Untersuchung der Effekte der entstehenden Metallspezies auf Organismen in der Umwelt naheliegend.

Allerdings stehen auch essentielle Metalle, wie z.B. das selbst nicht redoxaktive Zink, in Verdacht an der Entstehung von oxidativem Stress und dessen Folgen, wie beispielsweise der Schädigung der DNA, beteiligt zu sein.

Die induktiv-gekoppelte Plasmamassenspektrometrie (ICP-MS) ist eine weitverbreitete Methode für die Bestimmung von Elementkonzentrationen und - in Kombination mit der Chromatographie - auch zur Elementspeziesanalytik.

Jedoch ist es mittels ICP-MS nicht möglich, Informationen über die chemische Struktur zu erhalten oder eine unbekannte Spezies zu identifizieren. Des Weiteren sind ICP-MS Analysen von Umweltproben oftmals problematisch wegen der Bildung von Interferenzen. Insbesondere die Analytik der Platingruppenelemente ist mittels ICP-MS nur unter dem extremen Aufwand der Matrixabtrennung möglich.

Hieraus ergibt sich für die vorliegende Arbeit die Aufgabenstellung eine ICP-MS basierte Methode zur Identifizierung unbekannter Metallspezies zu entwickeln. Dazu sollen sowohl weiche und strukturerhaltende Ionisationsmethoden wie die Elektrospray-Ionisation, als auch harte elementspezifische Techniken, wie das ICP-MS komplementär verwendet werden. Neben dem Aufbau einer parallelen online-Detektionsmethode mit o.g. Ionisierungsmethoden nach flüssigchromatographischer Trennung, sollen diese Techniken auch einzeln weiterentwickelt werden.

Für das ICP-MS bedeutet das die Minimierung der Interferenzen für die Analyse von Platingruppenelementen. Insbesondere die Möglichkeit zur Quantifizierung der Platingruppenelemente Palladium und Platin bei hohen Konzentrationen interferenzbildender Ionen ohne vorherige Matrixabtrennung mittels ICP-MS soll untersucht werden.

Weiterhin sollen die Vorteile der hochauflösenden Massenspektrometrie mit der schonenden Ionisation der Elektrospray-Quelle für die Elementspeziesanalytik zugänglich gemacht werden.

Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf dem Zink-Glutathion-Wechselspiel vor dem Hintergrund des oxidativen Stresses. Zum besseren Verständnis der Abläufe soll ein Zn-GSH-Komplex synthetisch hergestellt und in seiner Struktur aufgeklärt werden.

Weiterhin soll zur Bestimmung von oxidiertem und reduziertem Glutathion in Realmatrices eine LC/MS-Methode entwickelt werden, um eine möglichst robuste und quantitative Methode zum Monitoring des oxidativen Stresses verwenden zu können.

## 2. Theoretischer Teil

Dieses Kapitel soll eine Einführung in den aktuellen Stand des Wissens geben und die vorliegende Arbeit in den wissenschaftlichen Kontext einordnen. Während der Schwerpunkt in Kapitel 2.1 auf allgemeine Grundlagen gelegt wurde, beschreibt Kapitel 2.2 den Stand der Technik in der Elementspeziation mit Relevanz für diese Arbeit.

### 2.1 Allgemeine Grundlagen

#### 2.1.1 Metalle und ihre Bedeutung für die (Öko-)Toxikologie, mit besonderer Berücksichtigung der Platingruppenelemente Palladium und Platin und des Zinks

Neben einigen essentiellen Metallen, die für verschiedene Aufgaben im Organismus benötigt werden, sind einige Metalle ohne physiologische Bedeutung oder wirken toxisch auf den Organismus.

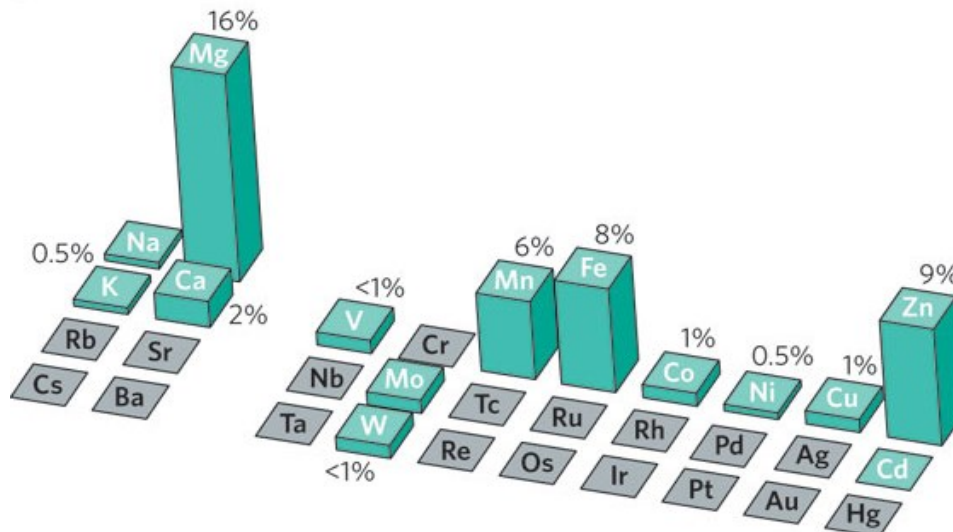


Abb. 1: Essentielle Metalle (grün) und der prozentuale Anteil an den bekannten Metallenzymen. Für die grauhinterlegten Metalle sind keine Metallenzyme bekannt. (Entnommen aus: [WALDRON et al. 2009]).

Eine erhöhte Verfügbarkeit eines Metalls kann zur Substitution eines anderen führen, wenn der Lebensraum bzw. die verfügbare Nahrung dieses erfordert [MARTIN et al. 1986]. Auch kann die erhöhte Exposition gegen Metallionen zu schädlichen Effekten wie die Blockade eines Enzyms führen. Oft treten die

Metallionen in Konkurrenz zueinander, um verfügbare Bindungsstellen zu besetzen.

Dieser Prozess kann qualitativ durch Pearsons Prinzip der harten und weichen Säuren und Basen (engl. „Hard and Soft Acids and Bases“, HSAB) erklärt werden [PEARSON 1968]. Zusammengefasst liefert dieses Konzept eine Vorhersagemöglichkeit über die bevorzugten Bindungen zwischen Lewis-Säuren und Lewis-Basen. Ionen und Elemente mit einem geringen Ionenradius, großer Ladungszahl und geringer Polarisierbarkeit werden als „hart“ bezeichnet. Dagegen werden Ionen mit großem Radius, geringer Ladungszahl und hoher Polarisierbarkeit als „weich“ charakterisiert.

**Tabelle 1: Klassifizierung der Lewis-Säuren und –Basen nach Pearson (Auszug aus [PEARSON 1968])**

	Säuren	Basen
Hart	$\text{H}^+$ , $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Fe}^{3+}$	$\text{H}_2\text{O}$ , $\text{OH}^-$ , $\text{CH}_3\text{COO}^-$ , $\text{ROH}$ , $\text{RNH}_2$
Weich	$\text{Cu}^+$ , $\text{Ag}^+$ , $\text{Pd}^{2+}$ , $\text{Pt}^{2+}$ , $\text{Cd}^{2+}$ , Elemente	$\text{R}_2\text{S}$ , $\text{RSH}$ , $\text{RS}^-$
Grenzfälle	$\text{Fe}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Bi}^{3+}$	$\text{Br}^-$ , $\text{NO}_2^-$

Konkret bedeutet das HSAB-Konzept, dass weiche Metalle wie Platin und Palladium bevorzugt über die schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein an Proteine binden. Metalle, die als „hart“ klassifiziert werden, tendieren zu einer Bindung über Carboxyl- oder Hydroxylfunktionen diverser Aminosäuren.

Im Folgenden soll wegen der Bedeutung für die vorliegende Arbeit insbesondere auf die Platingruppenelemente (PGE) Palladium und Platin näher eingegangen werden. Des Weiteren wird auch das essentielle Metall Zink in den Kontext der Arbeit eingeordnet.

### **Die Platingruppenelemente Palladium und Platin**

Neben Palladium (Pd) und Platin (Pt) zählt man auch die Elemente Ruthenium (Ru), Rhodium (Rh), Osmium (Os) und Iridium (Ir) zu den Platingruppenelementen. Diese Elemente sind im Allgemeinen reaktionsträge und werden wiederum zusammen mit Silber (Ag) und Gold (Au) zu den



Edelmetallen gezählt. Die PGE sind oft miteinander vergesellschaftet und verfügen über untereinander vergleichbare chemische Eigenschaften, was in der Ähnlichkeit der Ionenradien bedingt durch die Lanthanoidenkontraktion begründet ist. Die industrielle Bedeutung liegt zum einen an ihrer Korrosionsbeständigkeit und zum anderen an den guten Katalyseeigenschaften der PGE. Laut der US-amerikanischen Bundesbehörde USGS (United States Geological Survey) wurden 2010 Platingruppenelemente mit einer Gesamtmasse von 257.000 kg in die USA importiert [LOFERSKI 2011]. Wie nachfolgende Abbildung zeigt, liegt der Anteil von Platin und Palladium zusammen bei ca. 89 % an der importierten Gesamtmasse.

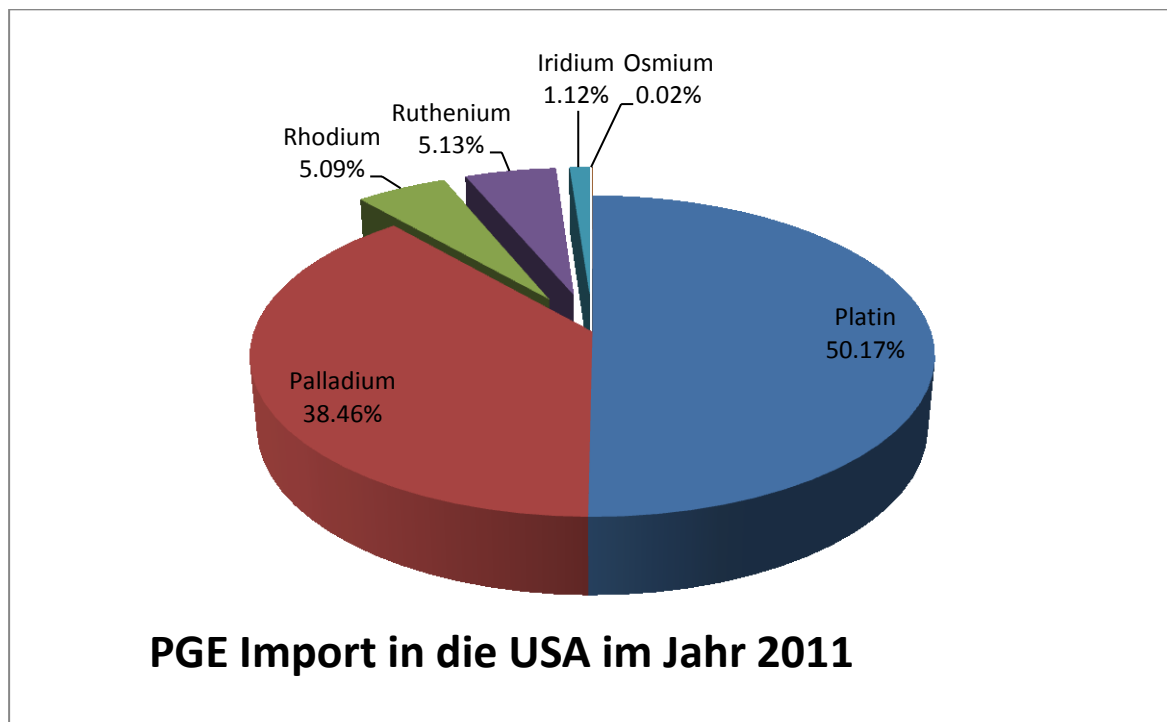


Abb. 2: Bedeutung von Palladium und Platin für die US-Wirtschaft in Relation zu den übrigen PGE. Im Jahr 2011 betrug die Gesamtmenge an Importierten PGE 257 t. (Diagramm erstellt mit den Daten aus: [LOFERSKI 2011]).

Aufgrund der zahlreichen Anwendungsmöglichkeiten der PGE besteht eine große Anzahl denkbarer Expositionswege in der Umwelt. Durch die Anwendung von Platin und Palladium als Hydrierungskatalysatoren in der chemischen Industrie finden sich Spuren des Katalysators in vielen großtechnisch hergestellten Produkten wieder (so zum Beispiel auch in

Silikonbrustimplantaten). Ein direkterer Weg in die Umwelt und damit auch in den Organismus erfolgt durch die Verwendung in Autokatalysatoren, wodurch Emissionen in Form von Katalysatorfeinstäuben in die Umwelt eingebracht werden. Für Platin sind bei Anreicherungsfaktoren von 5-6 Größenordnungen in der Literatur Konzentrationen im unteren  $\mu\text{g/g}$ -Bereich (ppm) dokumentiert [Hoppstock & Sures 2004]. Eine Substitution des Platins in den Autokatalysatoren durch Palladium zeigt eine vergleichbare Tendenz zur Akkumulation auf. In Straßenstaub aus Münchener Verkehrstunneln wurden Pd-Konzentrationen bis zu  $0,5 \mu\text{g/g}$  ermittelt [Leopold et al. 2008]. Die Mobilität von Palladium in der Umwelt, sowie die damit verbundene Aufnahme durch Mensch, Tiere und Pflanzen ist gegenüber der von Platin erhöht [Zimmermann & Sures 2004]. Ebenso können bereits bei geringen Palladiumkonzentrationen im Gegensatz zu anderen Schwermetallen signifikante Wirkeffekte beobachtet werden [Battke et al. 2008, Frank et al. 2008, Hoppstock & Sures 2004]. In Zellexpositionsversuchen konnte ein erhöhtes Effektniveau des Palladiums gegenüber Platin und Rhodium bestätigt werden [Sures et al. 2006].

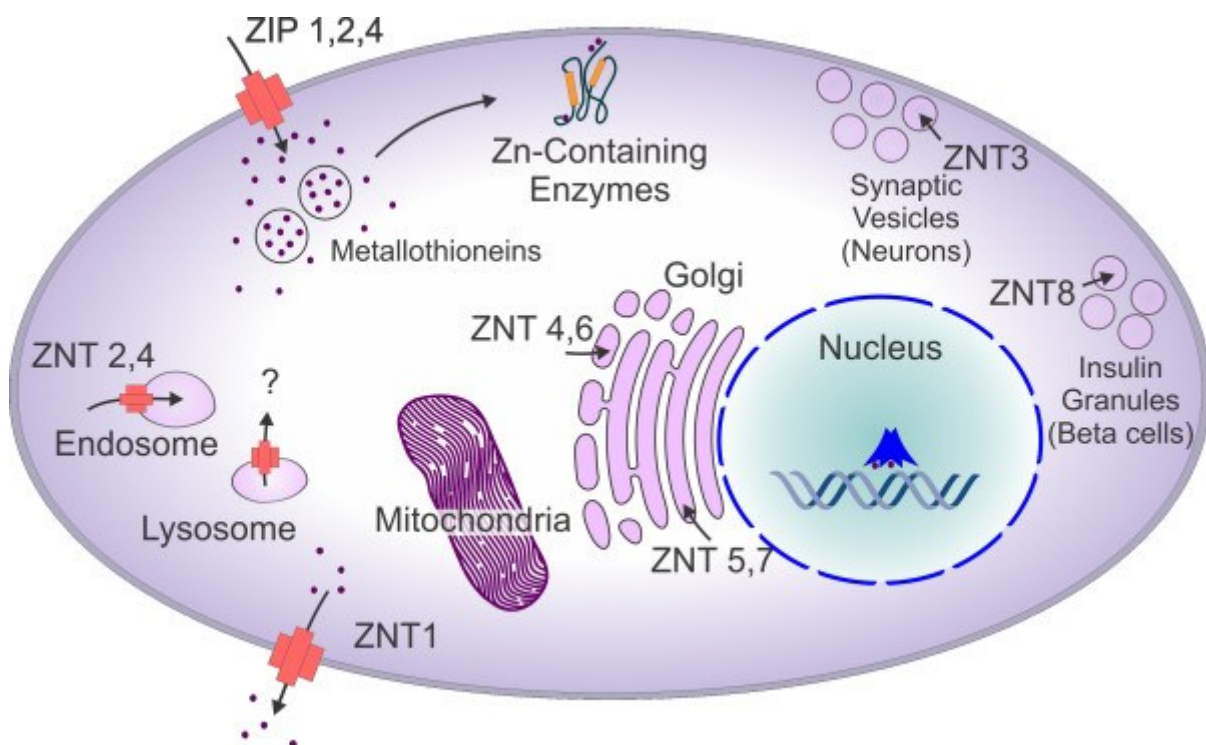
Ein weiterer Weg der PGE in die Umwelt kann sekundär aufgrund der Verwendung in der Medizin erfolgen. Einerseits ist ein Umwelteintrag durch den Abrieb verwendeter Implantate, wie z.B. Ag-Pd-Legierung in der Zahntechnik [v. Tümping 1991] möglich. Andererseits kann besonders das Platin als Bestandteil von Zytostatika (cis-Platin bzw. Carbo-, Oxali- und Satraplatin), die in der Tumorthherapie eingesetzt werden, über renale Ausscheidung in die Kanalisation und somit in den Abwasserkreislauf gelangen. Dabei wird von einer renalen Eliminierungsrate von bis zu 50 % des verabreichten Platins ausgegangen [Reichl 2009].

### **Das Element Zink und seine physiologische Bedeutung**

Das essentielle Element Zink ist an zahlreichen physiologischen Prozessen beteiligt. Wie nachfolgend in Kapitel 2 näher erläutert wird, trägt Zink bei Enzymen zur Strukturbildung bei oder kann als katalytisches Zentrum dienen.

Die katalytische Aktivität des Zinks beruht dabei auf einer tetrahedralen Struktur, die während der Katalyse in einen fünffachkoordinierten trigonal-bipyramidalen Komplex übergeht [KLEIFELD et al. 2003].

Neben der Katalyse hat das Zink zahlreiche Funktionen im Organismus und ist in vielen Funktionen innerhalb der Zelle vertreten. Nachfolgende Abbildung stellt schematisch die Rolle des Zinks in einer eukaryontische Zelle dar:







**Abb. 3:** Die Verteilung des Zinks in der Zelle, wobei die violetten Punkte Zinkionen symbolisieren. Der Transport des Zinks erfolgt über die Zinktransporter ZIP und ZNT. Als ZIP werden diejenigen Transporter bezeichnet, die Zink in das Zytosol transportieren, während die Transporter mit der Bezeichnung ZNT Zink aus dem Zytosol entfernen. (Abbildung entnommen aus: [JOHN et al. 2010]).

Der Transport des Zinks innerhalb der Zelle und in die Organellen erfolgt über Zinktransporter. Dieses transportierbare ionische Zink innerhalb der Zelle wird im Allgemeinen als „freies Zink“ bezeichnet [JIANG et al. 1998] und in der Literatur oft mit ionischem  $\text{Zn}^{2+}$  gleichgesetzt [SEKLER et al. 2007]. Jedoch ist aufgrund der hohen Bindungskonstanten zu Zink-bindenden Proteinen und zum intrazellulär sehr abundanten Glutathion das Auftreten von  $\text{Zn}^{2+}$  im Zytosol sehr unwahrscheinlich und würde im pico- bis nanomolaren Bereich liegen [MARET 2000]. Ein sehr wichtiges dieser Zink-bindenden Proteine ist das

Metallothionein, das innerhalb der Zelle als hauptsächlicher Zinkspeicher fungiert und dadurch großen Einfluss auf die Zink-Homöostase hat [MARET 2011]. Eine Änderung des zellulären Zinkgleichgewichts steht in Verbindung mit zahlreichen Erkrankungen bzw. Fehlfunktionen in der Zelle. So ist beispielsweise Zinkmangel eine Erklärung für ein schwächeres Immunsystem bei älteren Menschen. Die oftmals im Alter nahrungsbedingt verringerte Zinkaufnahme führt zu einer verringerten Aktivität der T-Zelllymphozyten. Eine Erklärung für diesen Effekt ist, dass dem Hormon Thymulin Zink als Kofaktor fehlt und die Zink-freie Form nicht zur Differenzierung der T-Zellen beiträgt [HAASE & RINK 2009]. Weiterhin führt Zinkdefizienz zu einer Depression verschiedener Zytokine. Speziell die anti-inflammatorischen Zytokine Interleukin-2 (IL-2), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) werden vermindert, die auch für die Abwehr von Tumoren verantwortlich sind [PRASAD et al. 1997, PRASAD et al. 1998, FOSTER & SAMMAN 2012].

Ebenso steht der Verlust der Zink-Homöostase in Verbindung mit Krebs. Je nach Tumorart kann dabei ein Anstieg oder eine Verminderung des Zinklevels im Gewebe oder Blut beobachtet werden:

Tabelle 2: Übersicht über die Änderung des Zinklevels bei verschiedenen Tumorarten (Vgl. Tabelle 3 in [JOHN et al. 2010])

Krebsart	Zinklevel	Literatur
<b>Brust, Gallenblase, Colon, Lunge</b>	Zink in Serum 	[SCHWARTZ 1975], [SCHLAG et al. 1978], [ISSELL et al. 1981], [GUPTA et al. 2005]
<b>Leber, Niere, Lunge</b>	Zink im Peritumorgewebe (verglichen mit dem gesunden und Gewebe und dem Tumor selbst) 	[SCHWARTZ 1975]
<b>Brust, Lunge,... (mit Ausnahme von Prostata)</b>	Zink im Tumorgewebe 	[SCHWARTZ 1975], [MARGALIOH et al. 1983]
<b>Prostata</b>	Zink im Tumorgewebe 	[SCHWARTZ 1975], [COSTELLO & FRANKLIN 2006], [GONZALEZ et al. 2009]

### 2.1.2 Aminosäuren, Peptide und Proteine

Grundbausteine der Peptide und Proteine sind die Aminosäuren. Dabei handelt es sich um Carbonsäuren, die neben der Carboxy- auch über eine Aminofunktion als funktionelle Gruppe verfügen. Zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit sind 21 proteinogene Aminosäuren bekannt, wovon 20 über Basentriplets (Codons) im genetischen Code verankert sind und als kanonisch bezeichnet werden. Diese 21 Aminosäuren sind in folgender Abbildung dargestellt:

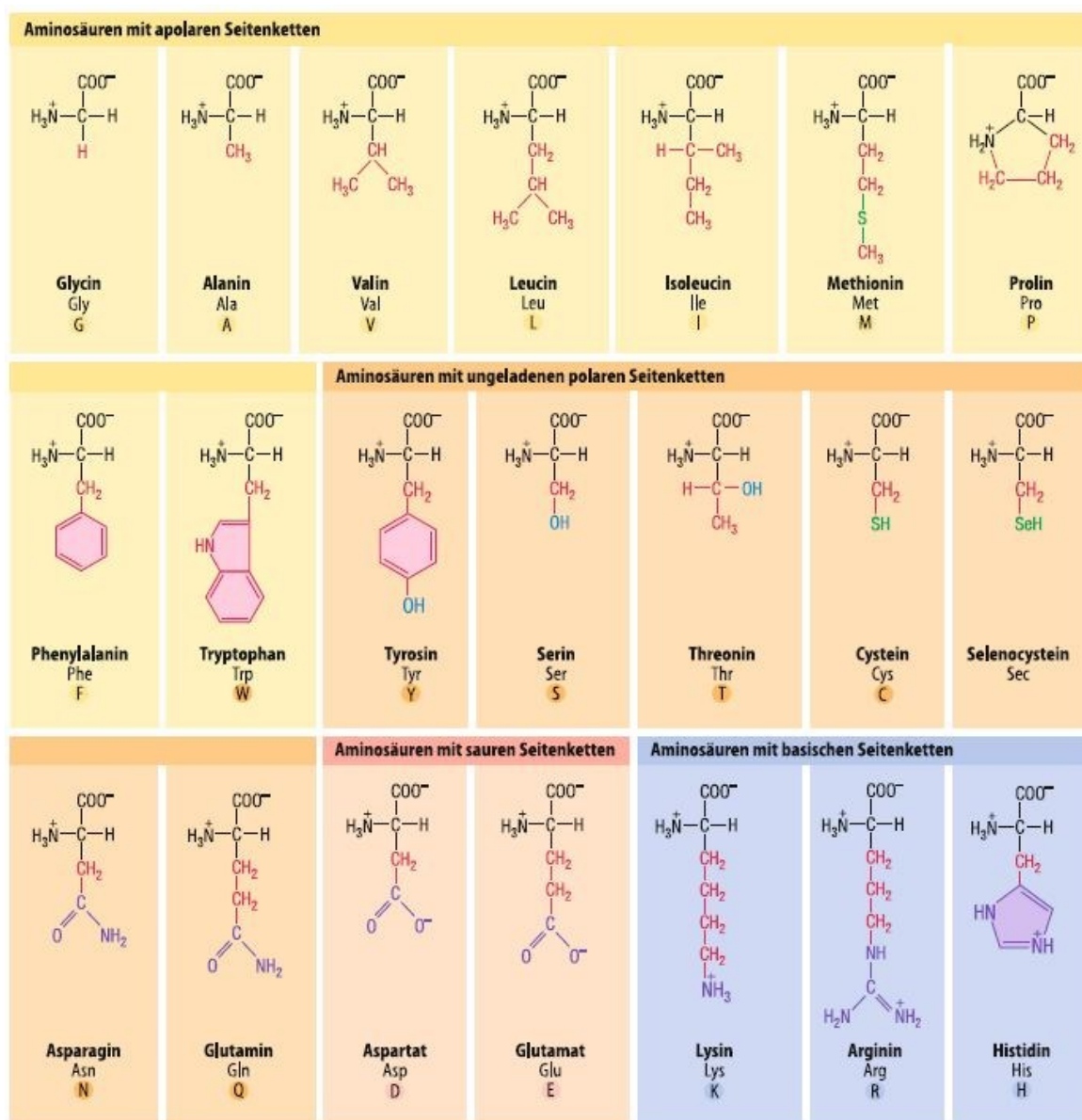


Abb. 4: Die 21 proteinogenen Aminosäuren (entnommen aus [LÖFFLER 2008]).

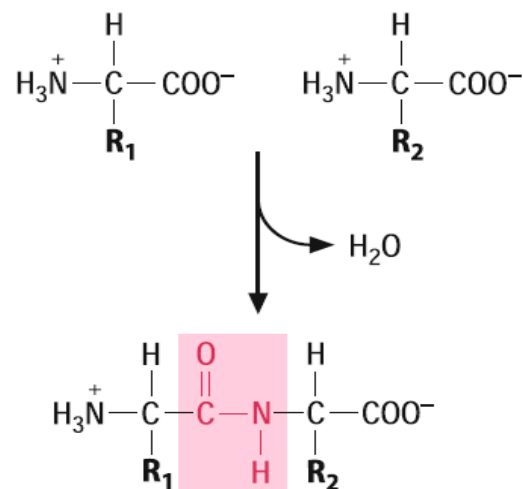
Eine Ausnahme bildet das Selenocystein, das nicht über ein Codon definiert ist, sondern aus einem tRNA gebundenem Serinmolekül entsteht [LÖFFLER 2008].

Die Verknüpfung zweier Aminosäuren erfolgt durch eine Kondensationsreaktion unter Ausbildung einer Säureamid-Bindung. Die Verkettung von zwei oder mehr Aminosäuren wird Peptid genannt, weswegen diese Säureamid-Bindung auch als peptidische Bindung bezeichnet wird. Der Begriff „Peptid“ ist griechischen Ursprungs und ist an das Wort  $\pi\epsilon\pi\tau\acute{o}\varsigma$  (dt. verdaut)

angelehnt, weil bei der Verdauung durch das Enzym Pepsin entstandene Fragmente als Kette von Aminosäuren identifiziert wurden. Charakteristisch für ein Peptid (ausgenommen Cyclopeptide) ist die Existenz einer endständigen Amino-Funktion (N-Terminus) und einer endständigen Carboxylfunktion (C-Terminus).

Das pseudo-Tripeptid Glutathion (GSH) ist intrazellulär eine der höchstkonzentrierten Verbindungen und spielt eine wichtige Rolle beim Abfangen von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), dem sogenannten Oxidativem Stress. [IWASAKI et al. 2009]

GSH erhielt seinen Namen 1921 von dem amerikanischen Biochemiker F. G. Hopkins, der diese Verbindung sowohl aus Selenhefe als auch aus Säugerzellen isolierte. Zunächst ging er jedoch davon aus, dass es sich bei dem isolierten Peptid um ein Dipeptid (bestehend aus Glutaminsäure und Cystein) handelt. Weiterhin beschreibt Hopkins bereits die Möglichkeit zur Ausbildung von



**Abb. 5: Ausbildung einer Peptidbindung durch die Kondensation eines Wassermoleküls. Die Darstellung zeigt eine zwitterionische Form mit protoniertem N-terminus und deprotoniertem C-terminus (Abbildung entnommen aus: [LÖFFLER 2008]).**

reversiblen Disulfidbrücken des von ihm isolierten Peptids unter dem Einfluss von Peroxidverbindungen. [HOPKINS 1921]

Die tatsächliche Aminosäuresequenz wurde 1935 bestimmt. GSH wurde als Tripeptid erkannt und die Abfolge der Aminosäuren als Glycin, Cystein und Glutaminsäure identifiziert. [HARINGTON & MEAD 1935]

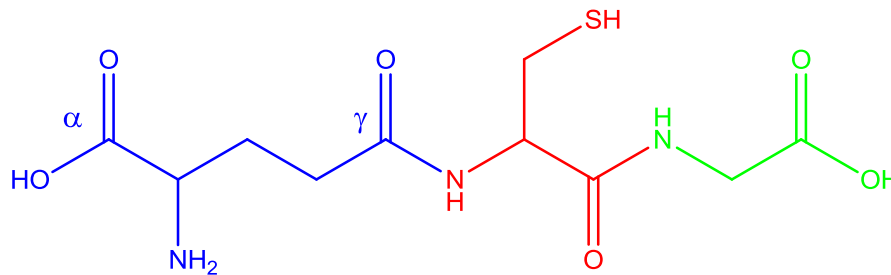
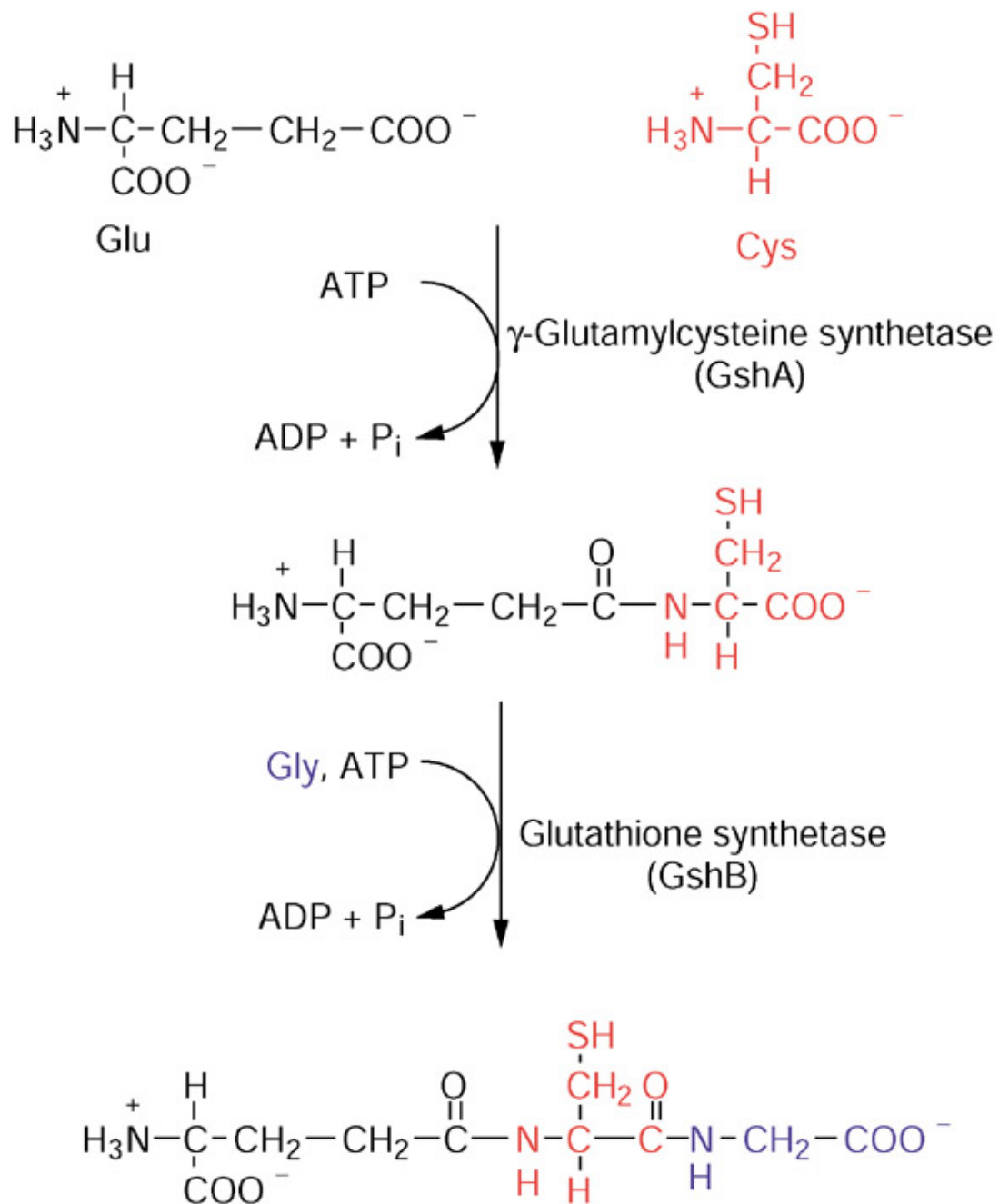


Abb. 6: Aufbau des Peptids  $\gamma$ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycin (Glutathion).

Da die Peptidbindung zwischen der Dicarbonsäure Glutaminsäure nicht über die  $\alpha$ -Carboxylfunktion sondern über deren  $\gamma$ -COOH-Gruppe ausgebildet wird, spricht man von einem „pseudo“-Tripeptid.

Die Biosynthese des Peptids erfolgt in einem Zwei-Stufen-Prozess: In einer ersten Stufe wird durch das Enzym  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase (GshA) unter Verbrauch von Adenosin Triphosphat (ATP) zu Adenosin Diphosphat (ADP) die Aminosäure Glutamin an Cystein gebunden. Das so entstandene  $\gamma$ -Glutamylcysteine wird in einem zweiten Schritt durch das Enzym Glutathion-Synthetase (GshB) - ebenfalls unter Phosphatabspaltung – an Glycin gebunden. [COPLEY & DHILLON 2002]





**Abb. 7: Biosynthese von Glutathion.** Glutaminsäure wird unter Energieverbrauch durch  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase (GshA) an Cystein gebunden. Die anschließende Kopplung der Aminosäure Glycin unter ATP-Verbrauch durch Glutathion-Synthetase vervollständigt GSH. [COPLEY & DHILLON 2002].

Von besonderer Relevanz ist die Thiolgruppe des Moleküls:

- a) Durch die hohe Affinität diverser (Schwer-)Metalle zum Schwefel können dieses über die SH-Gruppe gebunden werden.

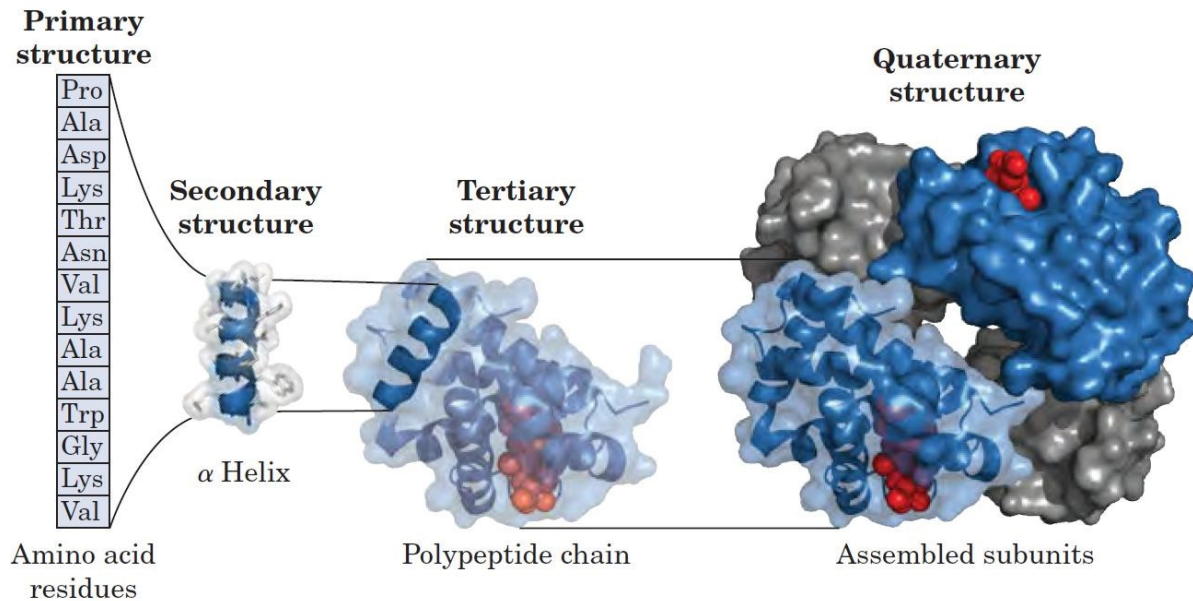


- b) Ebenso relevant ist die Ausbildung einer Disulfid-Brücke mit einem weiteren Glutathionmolekül bei gleichzeitiger Oxidation der beteiligten Schwefelatome.

Die analytische Herausforderung nebeneinander GSH und die oxidierte Form GSSG chromatographisch zu trennen und anschließend im Konzentrationsbereich einiger  $\mu\text{mol/L}$  aus komplexen Probenmatrices zu bestimmen, wird in der Regel nach Derivatisierung und anschließender Umkehrphasenchromatographie durchgeführt. Abhängig vom Derivatisierungsreagenz kann entweder die Detektion elektrochemisch oder mittels Fluoreszenz erfolgen. Auch die Massenspektrometrie nach Elektrospray-Ionisation (ESI) wird angewandt [IWASAKI et al. 2009]. Neben dem aufwändigeren Probenvorbereitungsprozess bei der Derivatisierung ist allerdings auch der Erhalt der Nativität der Probe fragwürdig [ROSSI et al. 2002].

Poröser auf Graphit basierender Kohlenstoff (Porous Graphitic Carbon, PGC) ist in der Chromatographie für seine gute Retention und Selektivität von polaren Verbindungen, wie beispielsweise underivatisierte Aminosäuren und Peptide bekannt [YAMAKI et al. 1996]. Weiterhin eignen sich die bei PGC-Phasen verwendeten Laufmittel gut für die Massenspektrometrie.

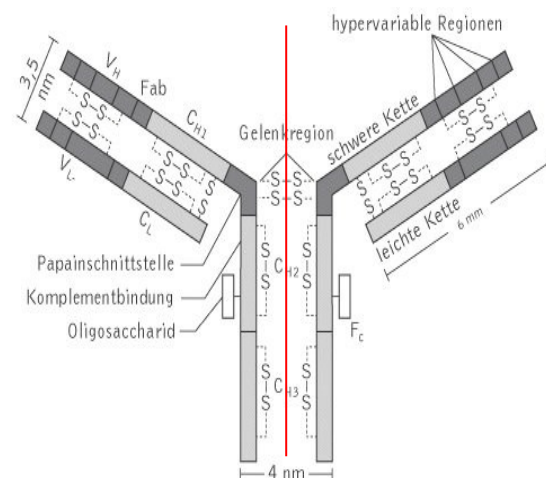
Als Proteine (altgriechischen:  $\pi\rho\omega\tau\epsilon\iota\omicron\varsigma$ , deutsch: grundlegend, vorrangig; veraltet auch Eiweiße) werden Abfolgen von ca. 100 und mehr Aminosäuren bezeichnet. Dabei erfolgt die Abgrenzung zu den Peptiden weniger aufgrund der Aminosäureanzahl, sondern primär über das Vorhandensein einer definierten räumlichen Struktur, der Proteinfaltung und der damit verbundenen biologischen Funktionalisierung des Moleküls. Typische Aufgaben der Proteine im Organismus sind beispielsweise Transporter für Metalle, Katalysator für chemische Reaktionen oder die Abwehr von Krankheitserregern.



**Abb. 8: Definition der räumlichen Struktur von Proteinen.** Die Primärstruktur besteht aus der Abfolge der Aminosäuren und wird an Ribosomen erzeugt. Die übergeordneten Strukturen ergeben sich einzig aus der Aminosäuresequenz. (Abbildung entnommen aus: [NELSON et al. 2008]).

Proteine werden an Ribosomen synthetisiert. Die Aminosäuresequenz wird von der Boten-Ribonukleinsäure (auch Messenger-RNA, mRNA) zum Protein übersetzt (Translation). Diese Abfolge der Aminosäuren bezeichnet man als Primärstruktur. Die Sekundärstruktur eines Proteins ist dieser übergeordnet und beschreibt wiederkehrende räumliche Strukturen. Typische Elemente sind z.B.  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen. Die Ausbildung einer Sekundärstruktur wird auch als Proteinfaltung bezeichnet und durch die Triebkraft der Ausbildung von

Wasserstoffbrückenbindungen vorangetrieben. Diese Struktureinheiten finden sich wiederum zur Tertiär- und Quartärstruktur zusammen. Auf dieser Strukturebene wird die Funktion des Proteins festgelegt. Die Bindung der einzelnen Polypeptidketten erfolgt häufig über Disulfidbrücken, sowie mittels nicht kovalenter Wechselwirkungen (Wasserstoffbrücken, elektrostatische und



**Abb. 9: Der Einfluss von Disulfidbrücken auf die Struktur von Proteinen am Beispiel des IgG.** Über Schwefelbrücken werden Tertiär- und Quartärstruktur des Proteins stabilisiert. (Abbildung entnommen aus: [Online-Kompaktlexikon der Biologie 2012]).

hydrophobe Wechselwirkungen). Beispielsweise werden Antikörper wie das  $\gamma$ -Immunoglobulin (IgG) hauptsächlich durch Disulfidbrücken in ihrer Struktur und somit auch in ihrer Funktion definiert. In Abb. 9 wird durch die rote Linie der Unterschied zwischen Tertiär- und Quartärstruktur verdeutlicht: Auf jeder Seite der Trennlinie befindet sich eine gleichartige Tertiärstruktureinheit, welche auch als Protomer bezeichnet wird. Durch Dimerisierung kommt es zur Ausbildung einer Quartärstruktur und damit verbunden zur Funktionsfähigkeit des Proteins.

Metall-induzierter oxidativer Stress kann ein sogenanntes „Disulfid-Scrambling“ induzieren [FIGUEIREDO-PEREIRA 1998]. Das bedeutet, die Schwefel-Schwefel-Bindungen werden homolytisch gespalten und die verbleibenden Schwefelradikale rekombinieren wahllos unter Verlust von Struktur und Funktion oder disproportionieren zum Thiol und Thioaldehyd [MOZZICONACCI et al. 2008].

### **2.1.3 Metallproteine: Schwerpunkt Metallothioneine**

Als Metallproteine bezeichnet man Proteine, die ein oder mehr Metalle binden. Dabei unterscheidet man weiter zwischen den Metall(o)enzymen, die das Metall zur Katalyse eines biochemischen Prozesses benötigen und den Metallspeicherproteinen, die zur Aufrechterhaltung der Metallhomöostase dienen. Etwa die Hälfte der in der Natur vorkommenden Proteine sind Metallproteine [LU et al. 2009].

Im Detail bedeutet dieses, dass Metalle großen Einfluss auf Biologie und Medizin haben. Zum einen können Metalle essentiell sein und als Cofaktor von Metallenzymen biochemische Prozesse in lebenden Organismen katalysieren. Ein typisches Beispiel hierzu sind die Superoxiddismutasen (SOD), [BANNISTER et al. 1987] eine Enzymklasse, die zum Abbau reaktiver Sauerstoffspezies in Tieren und Pflanzen beiträgt und somit Proteine und Genom vor oxidativer Schädigung schützt. Daher ist dieses Enzym in allen sauerstoffbasierten Lebensformen bekannt [FRIDOVICH 1974].

Das Metall, das an der Katalyse beteiligt ist, unterscheidet sich dabei nach Organismus und Lokalisation des Proteins. In der Regel bindet SOD im Zytosol eukaryotischer Zellen je ein Kupfer- und Zinkion (Cu-Zn-SOD) [RICHARDSON et al. 1975]; in den Mitochondrien dagegen liegt SOD als eine Manganspezies vor [WEISIGER & FRIDOVICH 1973]. Ebenso findet man Mn-SOD in prokaryotischen Zellen [KEELE et al. 1970]. Für Streptokokken der Art *Streptococcus mutans* konnte gezeigt werden, dass zur Funktion des Enzyms das Metall eine untergeordnete Rolle spielt und substituierbar ist. Je nach Verfügbarkeit im Nährmedium konnte entweder SOD mit Eisen oder Mangan als Cofaktor gefunden werden [MARTIN et al. 1986].

Unabhängig vom gebundenen Metall katalysieren alle Varianten des Enzyms den Abbau des Superoxidions gemäß folgendem Katalysezyklus:

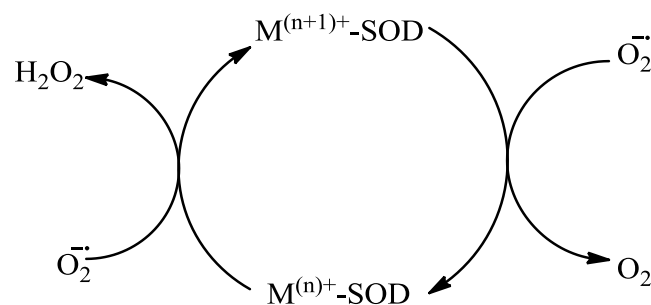


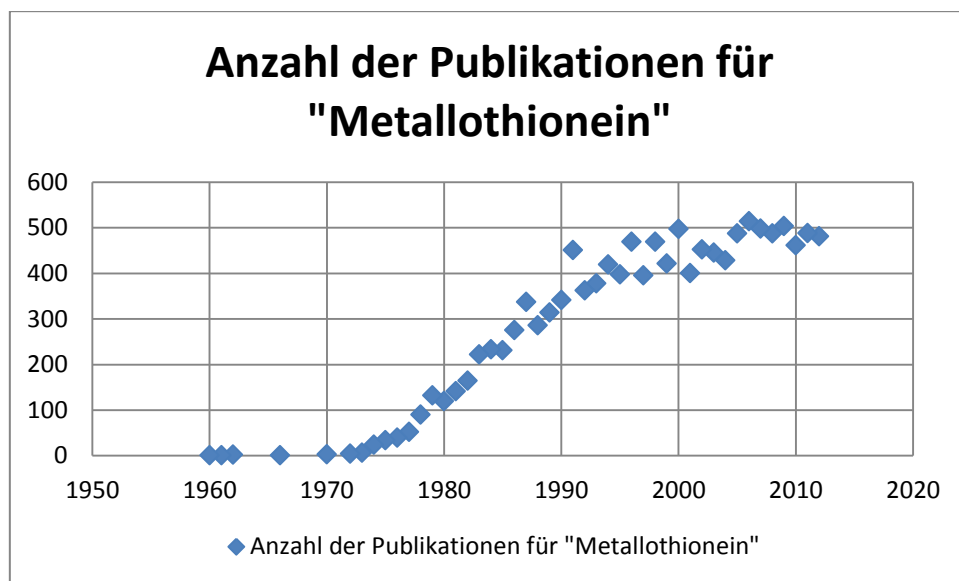
Abb. 10: Katalytischer Abbau des Superoxidradikals unter Veränderung der Oxidationsstufe des Metalls.  
Für M = Cu (n=1); Mn (n=2); Fe (n=2).

Das während der Reaktion aus Abb. 10 entstandene Wasserstoffperoxid wird durch ein weiteres Metallprotein - die Katalase – ein Häm-Eisen enthaltendes Enzym zu Wasser und Sauerstoff abgebaut [GOODSELL 2004].

Die Aufnahme von Metallionen ist durch komplexe Mechanismen reguliert. Zur Aufrechterhaltung der Homöostase, d.h. des Gleichgewichtszustands eines Metalls in beispielsweise Zytosol oder Plasma, werden Metallspeicherproteine erzeugt [BLEACKLEY & MACGILLIVRAY 2011]. Ein Beispiel hierfür ist das Ferritin, ein globuläres Protein, das bis zu 4500 Eisenionen speichern kann [MANN et al. 1986] und im Zytosol vieler tierischer Lebensformen vorkommt.

[ANDREWS et al. 1992]. Besonders bei einer erhöhten Aufnahme antwortet der Organismus in der Regel durch eine Erhöhung natürlicher Chelatbildner, wie zum Beispiel Glutathion (speziell bei Exposition über einen längeren Zeitraum) [EL-MARAGHY et al. 2001] oder durch Phytochelatine bei Pflanzen [COBBETT 2000]. Auch ist die Hochregulierung von Speicherproteinen wie beispielsweise den Metallothioneinen zahlreich in der Literatur dokumentiert (z. B. [PIOTROWSKI et al. 1974], [MOURGAUD et al. 2002], [BABULA et al. 2012]).

Bei den Metallothioneinen (MT) handelt es sich um cysteinreiche Proteine mit einer Masse von 5 000 – 10 000 Dalton [SIGEL et al. 2009], die seit ihrer ersten Isolierung aus der Pferdeniere im Jahr 1957 [MARGOSHES & VALLEE 1957] mit über 12 000 Publikationen eine wichtige Rolle in der wissenschaftlichen Forschung einnehmen.



**Abb. 11: Anzahl der Publikationen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften (peer-reviewed) zum Suchwort „Metallothionein“ in der Literaturdatenbank Scopus. Aufsummiert ergibt sich eine Zahl von 12900 Publikationen (Stand November 2012).**

Die Bedeutung dieser Proteinklasse resultiert in der Vielseitigkeit und Mannigfaltigkeit des Metallothioneins. Neben der großen Anzahl verschiedener Isoformen unterscheiden sich die Proteine unterschiedlicher biologischer Spezies in ihrer Sequenz teilweise deutlich.

Die folgende Tabelle liefert eine Übersicht über die Klassifikation der Metallothioneine und die damit verbundene Nomenklatur am Beispiel der MTs des Menschen.

**Tabelle 3: Übersicht über die Klassifikation der Metallothioneine. Übersetzt aus dem Englischen [THIRUMOORTHY et al. 2011]**

Fall	basierend auf		Klassifizierung
1	gebundenem Metall		Major-MT-1 & MT 2 Minor -MT-3 & MT-4
2	Proteine, die durch Gene auf dem Chromosom 16q13 codiert sind		MT Ia, MT Ib, MT Ic, usw.
3	biologisches System	Zentrales Nervensystem Neuronen	MT-I, MT-II und MT-III MT-III
4	Familie der Eukaryoten und einige Prokaryoten	Proteine mit Ähnlichkeit zu Säugetier-MT Proteine ohne Ähnlichkeit zu Säugetier-MT genetisch nicht codierte Peptide	MT-i MT-ii MT-iii
5	Expression im Gewebe	Leber und Niere Gehirn und männliche Sexualorgan spezifischen Gewebeschichten	MT-I und MT-II MT-III MT-IV

Neben der Regulierung der Metallhomöostase übernehmen die Metallothioneine noch weitere wesentliche Aufgaben. Dazu gehören die Detoxifizierung von (Schwer-)Metallen [BREMNER 1987] über die Bindung der Metalle durch die zahlreichen Thiolgruppen, sowie der Schutz der DNA und der Zellbestandteile vor oxidativem Stress und reaktiven Sauerstoff-Spezies (*ROS*) [SATO & BREMNER 1993] durch die Ausbildung von Disulfidbindungen.

Für den Menschen ist die physiologische Bedeutung der Metallothioneine am umfangreichsten erforscht. Hier werden die MTs in der Fachliteratur in Zusammenhang mit einer Vielzahl an Erkrankungen genannt:

**Tabelle 4: Exemplarische Auswahl von Erkrankungen, die mit Metallothioneinen in Verbindung stehen**

Erkrankung	Zusammenfassung der MT-Bedeutung	Literatur
Krebs (z. B. Brustkrebs)	Überexprimiertes MT in malignem Gewebe gefunden, MT-1e konkurriert mit Östrogen	[CHERIAN et al. 2003]
Neurodegenerative Erkrankungen (z. B. Alzheimer)	MT signifikant oxidiert in Gehirnen von Alzheimer-Patienten	[RICHARZ & BRATTER 2002]
Hypertrophe Kardiomyopathie	These: MT-1 wirkt als Apoptosehemmer	[MIYAZAKI et al. 2006]

In der Umwelt(analytik) ist das Metallothioneingleichgewicht ebenfalls von Bedeutung. Die MT-Konzentrationen sind ein Indikator für die Schwermetallbelastung eines Organismus und werden daher beispielsweise zum Biomonitoring von aquatischen Systemen eingesetzt [LIVINGSTONE 1993]. Neben Studien zur (Schwer-)Metallbelastung in Fischen [ROTCHILL et al. 2001 HAMILTON & MEHRLE 1986, CHAN 1995] wird auch das Akkumulationsverhalten von Metallen in *Dreissena Polymorpha* untersucht [de LAFONTAINE et al. 2000]. Für das Platingruppenelement Palladium wurde durch die Hochregulation von MT gezeigt, dass Pd ein toxisches Element für die Dreikantmuschel ist [FRANK et al. 2008].

#### 2.1.4 Die Zebra- und Dreiecksmuschel (*Dreissena Polymorpha*) als Bioindikator

Die Dreikantmuschel (*Dreissena Polymorpha*) - auch Zebra-, Dreiecks- oder Wandermuschel genannt – ist eine braun weiß gestreifte Süßwassermuschel, die ihren Namen aufgrund ihrer typischen dreiecksförmigen Grundfläche erhalten

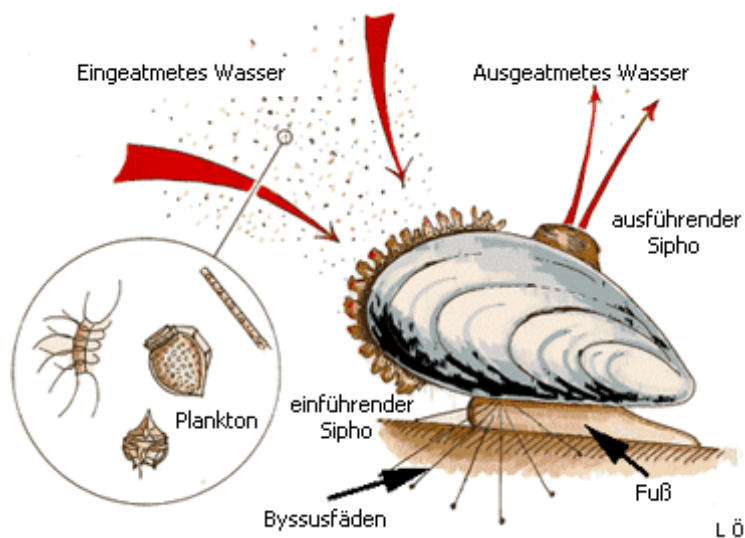


Abb. 12: Anhaftende Dreikantmuscheln auf einem Stein. (Gefunden und fotografiert bei der Muschelernte in Haltern, NRW).

hat. Auch wenn sie bereits 1771 von Pallas klassifiziert wurden, zählt man die Dreikantmuscheln zu den Neobiota, da diese nach ihrem Verschwinden wieder aus dem Schwarzen Meer über die Donau nach Mitteleuropa eingeführt worden ist [JOHNSON & CARLTON 1996]. Es handelt sich um eine invasive Spezies, die



bedingt durch den Schiffsverkehr als adulte Muschel mittels Anhaftung an Schiffsrümpfen oder im Ballastwasser während des Larvenstadiums verbreitet wird. Vorhandene Großmuscheln oder Wasserpflanzen werden durch das Anheften der *Dreissena Polymorpha* in ihrem ursprünglichen Lebensraum gestört. Auch technische Einrichtungen der Wassergewinnung oder Rohrleitungen können durch Dreikantmuschelpopulationen in ihrer Funktion eingeschränkt werden [CONNELLY et al. 2007]. Aufgrund der hohen Filtrationsrate der Muscheln von 0,5 - 0,7 L/Muschel/h [KRYGER & RIISGÅRD 1988] akkumulieren die Muscheln große Mengen an gelösten Schad- und Schwebstoffen, so dass sie sich aufgrund der weiten Verbreitung sehr gut als Bioindikatoren für limnische Ökosysteme eignen und in Deutschland beispielsweise für die Umweltprobenbank des Bundes auf ihre Schadstoffgehalte untersucht und archiviert werden [ROSSBACH et al. 1992]. Die Filtration des Gewässers und dadurch bedingt die Anreicherung erfolgt bei der Atmung.



**Abb. 13: Die Atmung der Muschel führt zur Akkumulation von Xenobiotika und Metallen im Muschelweichgewebe. (Abbildung entnommen aus:[NORDSIECK ET AL. 2012]).**

Neben diversen Xenobiotika [BINELLI et al. 2006] sind zahlreiche Studien zur (Schwer-) Metallbelastung der Dreikantmuschel in der Literatur dokumentiert [KWAN et al. 2003, CAMUSSO et al. 2001, LUSCHÜTZKY 2005]. Wegen der größeren Ortstreue,

sowie aufgrund des Anreicherungseffekts und der damit verbundenen analytischen Empfindlichkeit werden die Muscheln komplementär zu Studien an Fischen als Bioindikator verwendet.



## **2.2 Instrumentell-analytische Methoden zur Elementspeziesanalytik**

### **2.2.1 Elementspeziation**

Unter Elementspeziation oder auch –speziierung versteht man laut IUPAC die analytischen Tätigkeiten zur Identifizierung und/oder zur Bestimmung des Gehalts einer oder mehr individueller chemischer Spezies in einer Probe.

Dabei ist eine chemische Spezies definiert als spezifische Form eines Elements in seiner Isotopenzusammensetzung, elektronischen oder Oxidationszustands und/oder seines Verbindungskomplexes bzw. seiner Molekülstruktur [MICHALKE 2003].

Eine Routinemethode in der Elementspeziesanalytik ist die Kopplung von Chromatographie mit einem elementselektiven Detektor, wie beispielsweise das ICP-MS. Dieser Aufbau eignet sich besonders zur Quantifizierung von Elementspezies im Spuren- und Ultraspurenbereich. Eine Speziesidentifizierung ist mittels ICP-MS nur bedingt möglich; aufgrund fehlender Strukturinformationen wird eine Identifizierung häufig auf Basis eines Retentionszeitabgleichs durchgeführt. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass Signale eines Elements fälschlicherweise einer Elementspezies zugeordnet oder falsch quantifiziert werden, weil eine unbekannte Spezies zu identischer Retentionszeit eluiert. Dieses Manko wird durch die sequentielle Verwendung der ESI-MS als strukturanalytische Methode kompensiert. Durch die Anwendung paralleler chromatographischer Läufe unter identischen Trennbedingungen gefolgt von entweder ICP-MS oder ESI-MS Detektion, wird eine erhöhte Sicherheit bei der Speziesidentifizierung erreicht.

## 2.2.2 (Flüssig-)Chromatographie

### 2.2.2.1 Allgemeines zur Chromatographie

Unter Chromatographie versteht man ein physikalisches Trennverfahren zum Auftrennen von Stoffgemischen, dass Anfang des 20. Jahrhunderts von Mikhail Tsvet publiziert wurde, der dieses Verfahren zur Fraktionierung von farbigen Pflanzenfragmenten verwendet hat. Diese Anwendung hat der Methode die Bezeichnung Chromatographie eingebracht, was sich aus den altgriechischen Worten χρώμα (Farbe) und γράφειν (schreiben) zusammensetzt.

Die chromatographische Trennung erfolgt aufgrund unterschiedlicher Wechselwirkungen der mobilen Phase mit der stationären Phase. Dabei unterscheidet man mit Verteilung und Adsorption im Wesentlichen zwei Trennprinzipien. Findet die Trennung der Stoffe aus der mobilen Phase aufgrund unterschiedlichen Adsorptionsverhaltens an einer stationären Phase statt, so spricht man von Adsorptions-Chromatographie. Wird dagegen die Stofftrennung durch einen Lösevorgang in zwei nicht miteinander mischbaren Phasen erreicht, so spricht man von Verteilungs-Chromatographie. Diese Prinzipien sind in den wenigsten Fällen allein für die Stofftrennung verantwortlich, sondern wirken synergetisch auf die Trennung ein. Durch die Verwendung eines Gases oder einer Flüssigkeit als mobile Phase unterscheidet man die beiden wichtigsten chromatographischen Trennverfahren; die Flüssig- und die Gaschromatographie, die beide durch identische Kennzahlen und Modelle beschrieben werden.

Ein Modell zur Beschreibung der chromatographischen Trennung ist das Modell der „Theorie der Böden“, welches von van-Deemter aufgestellt worden ist [VAN DEEMTER et al. 1956]. Hierbei wird die Trennsäule mit einer Fraktionierkolonne verglichen, indem die Säule in theoretische Böden aufgeteilt wird. Anschaulich bedeutet dieses, dass ein Stück der Trennsäule als Trennboden einer Kolonne angesehen wird. Die Peakform und Effizienz der Trennung wird dabei durch die Fließgeschwindigkeit  $u$  in der van-Deemter-Gleichung beeinflusst.

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u = HETP = \frac{L}{N} \quad \text{Gleichung 1}$$

mit: H: Bodenhöhe

A: Eddy-Diffusion

B: Longitudinal-Diffusion

C: Stoffaustausch mit der stationären Phase

u: Fließgeschwindigkeit

L: Länge der Trennsäule (in mm)

N: Anzahl der vorhandenen (theoretischen) Trennstufen

Das Minimum der durch Gleichung 1 dargestellten Funktion liefert die optimale Fließgeschwindigkeit, bei der die Bodenhöhe am geringsten ist. Folglich ist in diesem Fall die Anzahl der theoretischen Böden bei konstanter Säulenlänge am größten, was zu höchsten Trennstärke und zu den geringsten Peakbreiten führt.

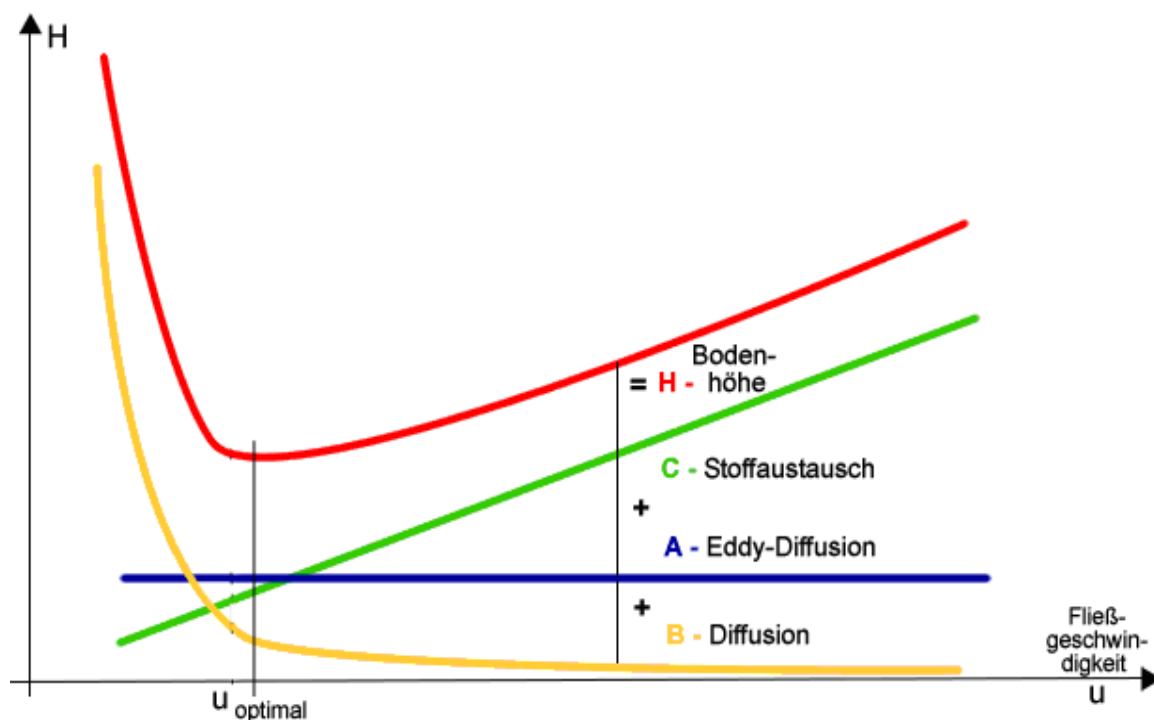


Abb. 14: van-Deemter-Gleichung [Zuern 2007].

Der Stoffaustausch-Term verliert mit kleiner werdenden Partikelgrößen der stationären Phase an Einfluss, so dass bei Partikelgrößen  $< 2 \mu\text{m}$  ( $< 3 \mu\text{m}$ ) die Fließgeschwindigkeit die theoretische Bodenhöhe kaum beeinflusst [CUNLIFFE & MALONEY 2007]. Die geringeren Partikelgrößen resultieren in einem höheren

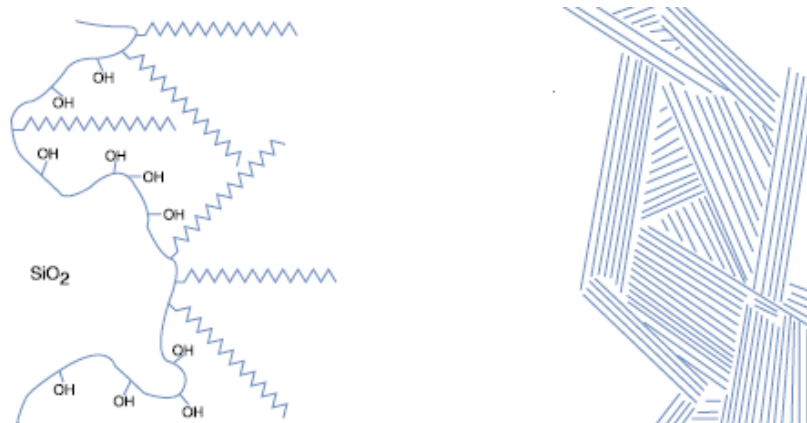
Gegendruck, weswegen man von U(H)PLC-Systemen (engl. Ultra High Pressure Liquid Chromatography) spricht. Vorteile der U(H)PLC sind deutlich schnellere Analysezeiten und folglich ein geringerer Lösemittelverbrauch, sowie durch die geringe Peakbreite ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis. Die wichtigsten Veränderungen dieser Methode gegenüber der HPLC sind die gestiegenen apparativen und methodischen Anforderungen:

- Bauteile der U(H)PLC müssen den Anforderungen von Druckbelastungen bis 1200 bar Stand halten.
- Aufgrund geringerer Porengrößen und Kapillardurchmesser muss besonders bei Realproben auf Partikel in der Lösung geachtet werden, da die verkleinerten Dimensionen das Verstopfen von Säule und Leitungen begünstigen.
- Durch die schnellere Chromatographie kommt es zu geringeren Peakbreiten. Daraus folgt die Notwendigkeit schnellerer Detektoren, um eine zur Quantifizierung hinreichende Anzahl von Messpunkten innerhalb eines Peaks zu gewährleisten.

#### **2.2.2.2 Stationäre Phasen der Flüssigchromatographie**

Unabhängig von der Größe der Partikel und damit verbunden HPLC oder U(H)PLC Bedingungen ist ein zentraler Punkt der Flüssigchromatographie die Wahl der stationären Phase. In der Flüssigchromatographie sind mittlerweile eine große Anzahl unterschiedlicher stationärer Phasen kommerziell erhältlich. Die Auswahl der Phase richtet sich dabei zum einen nach dem Trennproblem (z.B. Polarität des Analyten, Erhalt der Nativität, Selektivität der Säule, ...) und zum anderen nach dem verwendeten Detektor. Hier muss besonders auf die Kompatibilität des Detektors mit der mobilen Phase geachtet werden. Beispielsweise führt die Verwendung einer hohen Pufferkonzentration bei ESI-MS Detektion zu einer Unterdrückung des Analytsignals, sowie bei schwerflüchtigen Puffern zu einem Verstopfen der ESI-Kapillare.

Eine der verbreitetsten Phasen ist das unpolare Octadecylsiloxan (eine sogenannte C18-Säule), die in der Regel zur Trennung wenig bis mittelpolarer Substanzen eingesetzt wird. Bei diesen Anwendungen wird als mobile Phase ein polarer Eluent gewählt. Typische Laufmittel sind Gemische aus wässrigem Puffer und organischem Lösemittel (Methanol, Acetonitril, *iso*-Propanol). Man unterscheidet zwischen isokratischer Elution mit einer während des Laufs konstanten Zusammensetzung der mobilen Phase und der Gradientenelution, bei der sich mit steigender Laufzeit die Zusammensetzung der mobilen Phase von hohem wässrigem zu hohem organischem Anteil ändert. Zur Trennung stark polarer bzw. ionischer Verbindungen mit der C18-Säule kann zur mobilen Phase ein sogenanntes Ionenpaarungsreagenz zugegeben werden, das aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkung mit den Analyten ein nach außen ungeladenes Ionenpaar ergibt.



**Abb. 15:** Oberflächenbeschaffenheit von C18-Säule (links) und einer Säule bestehend aus PGC (rechts) entnommen aus [THERMO SCIENTIFIC CORPORATION 2004b].

Eine stationäre Phase, die sich zur Trennung polarer und sehr polarer Verbindungen wie Aminosäuren und Nukleotide eignet, ist eine Säule gefüllt mit porösem graphitischem Kohlenstoff (PGC). Die Retention beruht in der Hauptsache auf den elektronischen Wechselwirkungen des LUMO (lowest occupied molecular orbital) des Analyten mit dem  $\pi$ -Elektronensystem des Graphits (vgl. Abb. 16) [PEREIRA 2008].

Bei stark polaren oder ionischen Verbindungen wird die Retention durch den Debye-Anteil der van-der-Waals-Kräfte zwischen den zu trennenden

Verbindungen und den induzierten Dipolen der frei beweglichen  $\pi$ -Elektronen des Kohlenstoffgitters begünstigt.

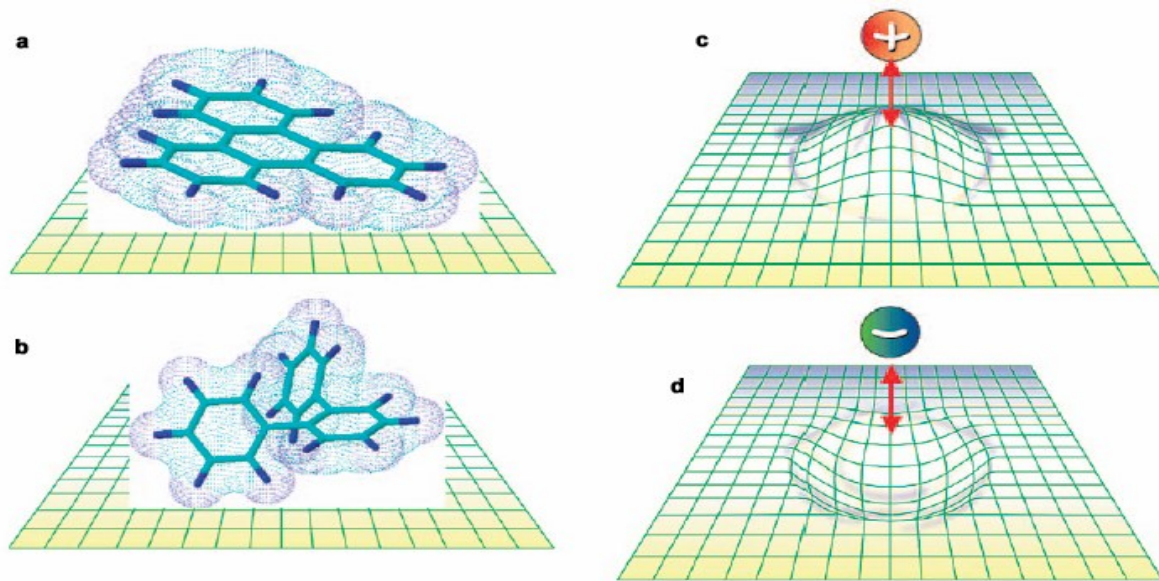


Abb. 16: *links*: Darstellung der Wechselwirkungen des LUMO mit dem  $\pi$ -Elektronensystem des Graphits. a) hohe Wechselwirkung bei planaren Molekülen. b) geringe Wechselwirkung bei nicht-planaren Molekülen. *rechts*: Retention beruhend auf einem induzierten Dipol aufgrund einer positiven Ladung (c) oder einer negativen Ladung (d) (Abb. entnommen aus [THERMO SCIENTIFIC 2009]).

Eine der PGC verwandte Phase ist Pentafluorophenyl (PFP) gebunden an Silikat. Die Bindung kann direkt oder mittels eines in der Regel unfluorierten Alkylspacers (meist Propyl) erfolgen. Der Retentionsmechanismus ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch wird ebenso von elektronischen ( $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen) oder induzierten Dipolen als mögliche Ursache der Retention ausgegangen. Dieses Säulenmaterial eignet sich ebenfalls zur Chromatographie mittel bis stark polarer Substanzen.

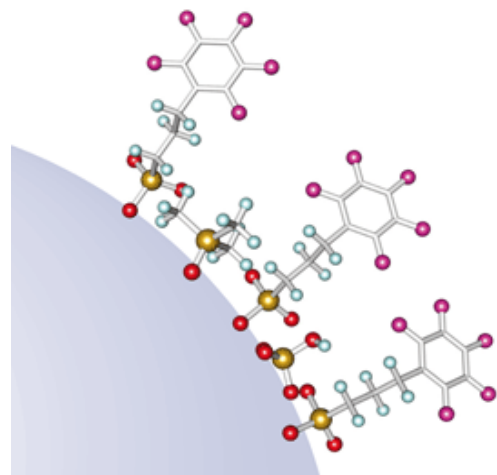
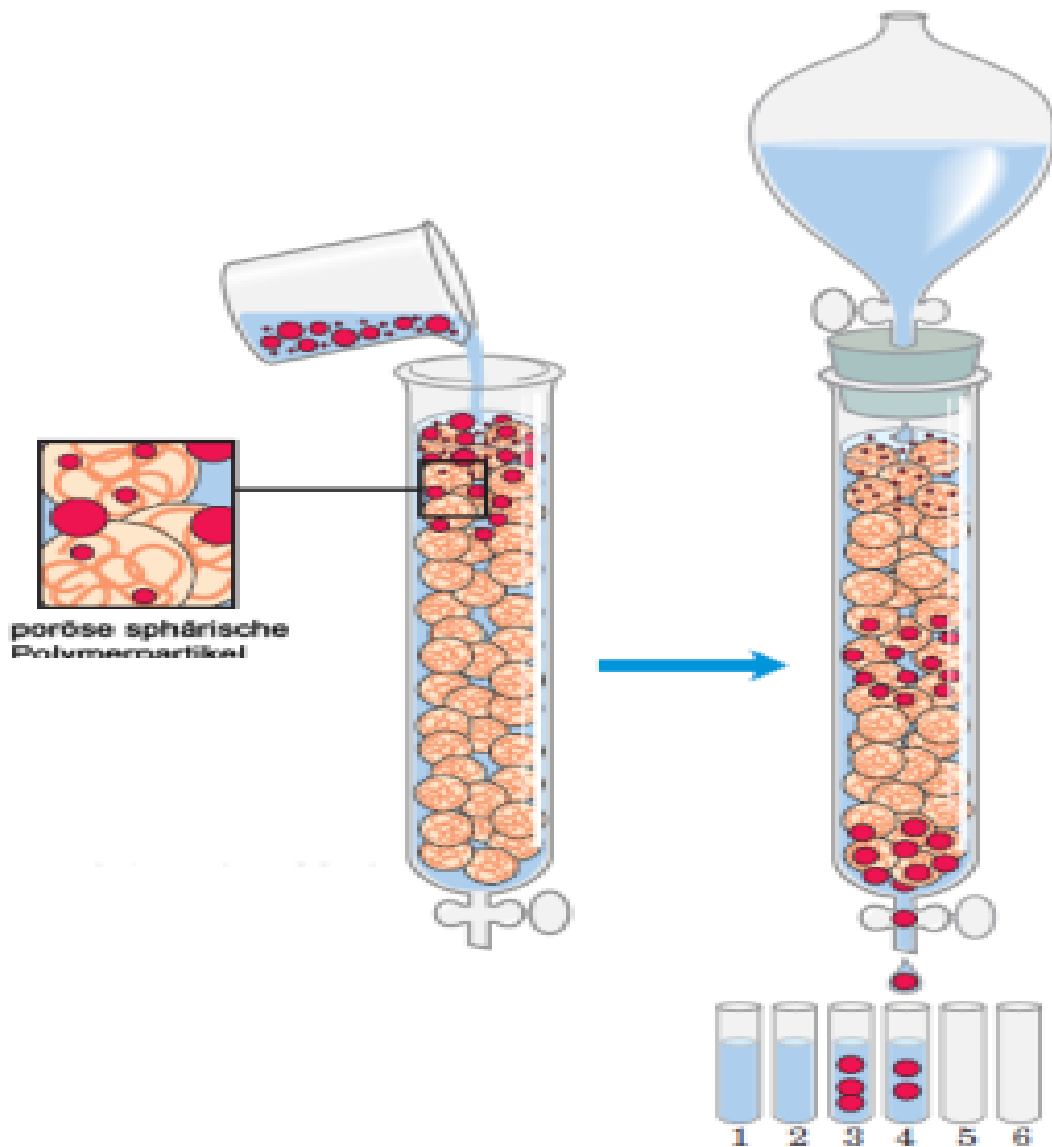


Abb. 17 Oberfläche einer PFP-Säule (Abb. entnommen aus [THERMO SCIENTIFIC 2009]).

Eine äußerst schonende und in Bezug auf Metallenzyme native Trennmethode ist die Größenausschlusschromatographie. Das Säulenmaterial ist porös, so dass die Analyten in diese Poren eindringen können. Da Verbindungen mit geringem



**Abb. 18: Prinzip einer SEC-Säule. Die Säule ist befüllt mit porösen spärlichen Polymerpartikeln. Kleine Moleküle dringen tiefer in die Poren ein und eluieren dadurch später als große Moleküle. (entnommen aus [SCHWEDT 2008]).**

hydrodynamischem Volumen tiefer und öfter in die Poren eindringen als solche mit einem großem Volumen - welche in der Regel auch eine größere Masse besitzen - eluieren letztere zuerst [SCHWEDT 2008]. Diese Methode wird in der Literatur gemeinhin als schonendes und natives Trennverfahren bezeichnet; die enzymatische Aktivität von Metallproteinen bleibt erhalten [DA SILVA et al. 2010].

### 2.2.3 Massenspektrometrie

#### 2.2.3.1 Grundlegendes zur Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie wurde im Jahr 1910 von J.J. Thomson erstmalig angewandt, indem die Neon-Isotope  $^{20}\text{Ne}$  und  $^{22}\text{Ne}$  voneinander getrennt wurden. 50 Jahre später hat sich die MS als Routineanalysemethode auch in der organischen Chemie durchgesetzt, da bereits mit geringen Substanzmengen auf einfache Weise Molekülmassen und Elementarzusammensetzung bestimmt werden können. Zur Analyse komplexer Substanzgemische hat sich besonders die Kopplung mit chromatographischen Techniken wie der Gaschromatographie (GC) oder der Flüssigchromatographie (LC) hervorgetan. Auch die Kopplung mit elektromigrativen Trennmethode gewinnt an Bedeutung [MICHALKE et al. 1999, PRANGE & PRÖFROCK 2005, YIN et al. 2008]. Durch die vorherige Substanztrennung können komplexe Substanzgemische auf den jeweiligen Trennsäulen in einzelne Fraktionen aufgetrennt werden und anschließend im Massenspektrometer (MS), welches als Detektor dient, identifiziert werden.

Das grundlegende Prinzip eines Massenspektrometers kann durch die Kombination der Lorentz-Kraft und des 2. Newton'schen Gesetzes beschrieben werden. Die Lorentzkraft stellt die Kraft dar, die von einem elektrischen oder magnetischen Feld auf einen bewegten Ladungsträger im Einfluss des Feldes ausgeübt wird. Die Lorentzkraft kann durch folgende Vektorgleichung beschrieben werden:

$$\vec{F} = q(\vec{E} + \vec{v} \times \vec{B}) \quad \text{Gleichung 2}$$

mit  $\vec{F}$ : Lorentzkraft

$q$ : Ladung des Ions

$\vec{E}$ : elektrische Feldstärke

$\vec{v}$ : Geschwindigkeit des Ladungsträgers

$\vec{B}$ : magnetische Flussdichte



Gleichzeitig sind die Ladungsträger Newtons 2. Gesetz unterworfen, für das bei konstanter Masse  $m$  gilt:

$$\vec{F} = \frac{d\vec{p}}{dt} = \frac{d(m\vec{v})}{dt} = m \frac{d\vec{v}}{dt} \quad \text{Gleichung 3}$$

mit  $\vec{F}$ : Kraft auf einen beschleunigten Körper

$\vec{p}$ : Impuls des Ladungsträgers

$t$ : Zeit

$m$ : Masse des Körpers

$\vec{v}$ : Geschwindigkeit des Ladungsträgers

Die Kombination der Gleichungen führt zu einer Differentialgleichung, die in Abhängigkeit von  $m/q$  die Bewegung eines geladenen Partikels in Zeit und Raum beschreibt:

$$\frac{m}{q} \frac{d\vec{v}}{dt} = (\vec{E} + \vec{v} \times \vec{B}) \quad \text{Gleichung 4}$$

In der Praxis der Massenspektrometrie ist es üblich die Ionenladung  $q$  mittels Elementarladung zu normieren und somit das Verhältnis der Masse  $m$  zur Ladungszahl  $z$  anzugeben.

Zur Bestimmung des Masse-zu-Ladung-Verhältnisses ( $m/z$ ) wird im Allgemeinen ein dreistufiger Aufbau eines Massenspektrometers verwendet:

1. Die Ionenquelle, in der auf verschiedene Arten geladene Teilchen erzeugt werden. Die Wahl der Ionisierung richtet sich in der Regel nach der analytischen Fragestellung und nach dem Analyten.
2. Den Massenfilter, der durch physikalisch messbare Größen wie beispielsweise die Oszillationsbewegungen der Ionen, eine Bestimmung des Masse-zu-Ladungsverhältnisses zulässt.
3. Der Detektor, welcher je nach Massenfilter beispielsweise zur Registration eines Ereignisses, wie das Auftreffen eines Ions auf eine Oberfläche dient oder die Frequenz oszillierender Ionen ermittelt.

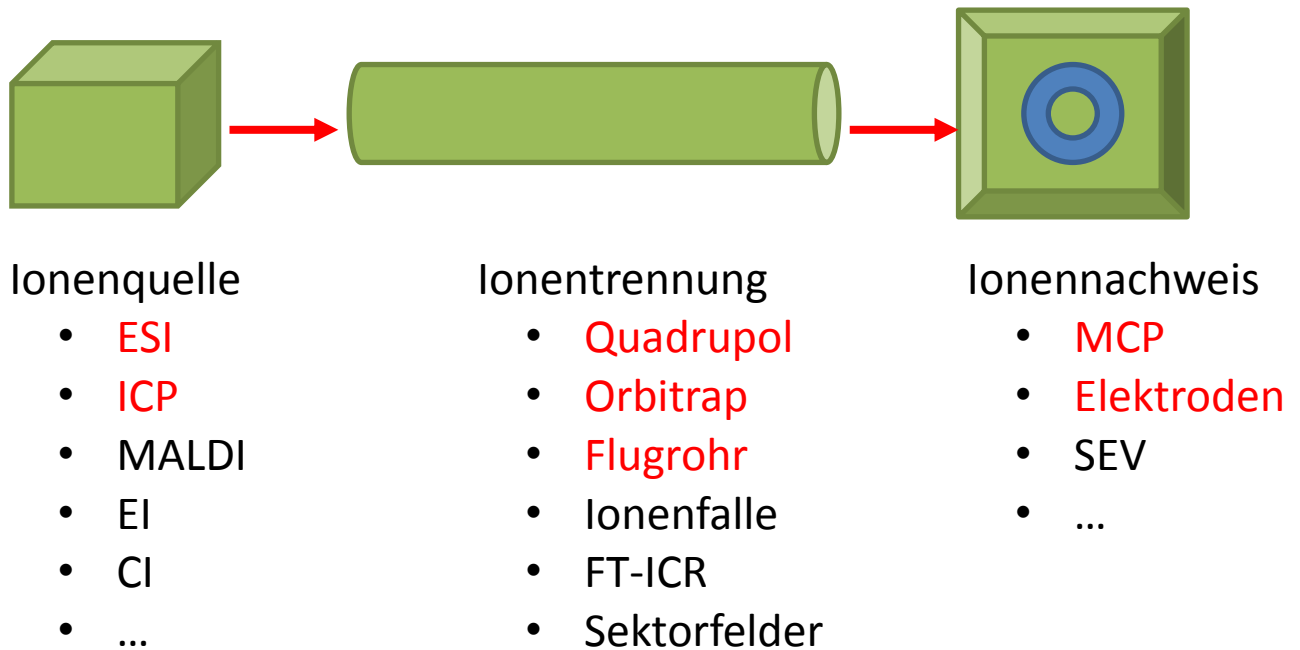


Abb. 19: Prinzipieller dreistufiger Aufbau eines Massenspektrometers.

Aufgrund der besonderen Relevanz für die vorliegende Arbeit sollen die in Abb. 19 rot-hervorgehobenen Begriffe und somit insbesondere die Funktionsweise von Massenspektrometern mit induktiv-gekoppeltem Plasma (ICP-MS) und Elektrosprayionisation (ESI) als Ionenquelle erläutert werden. Ebenso wird der Schwerpunkt der Massenanalysatoren auf das Quadrupol, Flugzeitmassenspektrometer und die Orbitrap gelegt. Abgesehen vom apparativen Aufbau unterscheiden sich die Massenspektrometertypen vor allem in ihrer Massenauflösung. Die Kationen werden durch ein elektrisches Feld beschleunigt, im Quadrupol gefiltert und anschließend im Detektor detektiert. Aufgrund der entstandenen Fragmente ist es möglich, auf die Struktur (metall)organischer Verbindungen zu schließen. Hierbei brechen insbesondere die schwachen Metall-Kohlenstoffbindungen, sodass sich die Massenspektrometrie sehr für die Speziesanalytik eignet.

Die entstandenen Fragmente werden im Massenanalysator nach ihrem Masse zu Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) aufgetrennt. Einer der gängigsten (weil u.a. günstigsten) Massenfilter ist der Quadrupol, bei dem es sich um vier parallel

angeordnete Metallstäbe handelt, die in Längsrichtung von den Fragmentionen passiert werden müssen. Für die Trennung in das  $m/z$ -Verhältnis gilt:

$$\frac{m}{z} = \frac{5,7 \cdot A}{(2\pi f \cdot r)^2} \quad \text{Gleichung 5}$$

mit: A: Amplitude des Wechselstroms  
 f: Frequenz des Wechselstroms  
 r: Radius zwischen den Stäben

Die stabilen Bahnen der Ionen im Quadrupol hängen von vielen komplexen Faktoren ab und können durch die Mathieu'schen Differentialgleichungen beschrieben werden [PAUL et al. 1958].

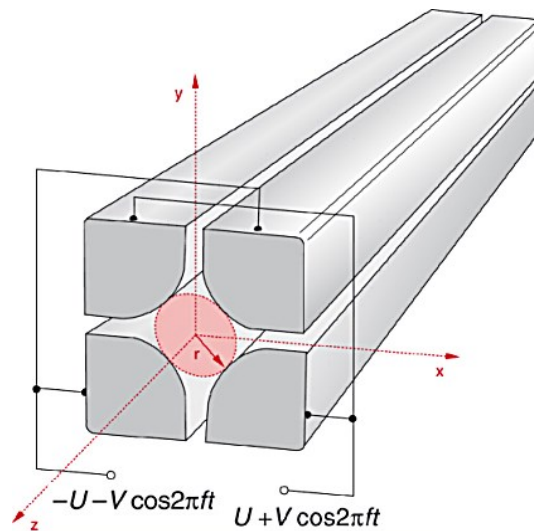


Abb. 20: Aufbau eines Quadrupolmassenfilters [LOTTSPEICH & ENGELS 2006].

Die Metallstäbe sind gegenüberliegend paarweise mit einer variablen Gleichspannungsquelle verbunden. Für die Massenauflösung des Quadrupols gilt die folgende Beziehung:

$$\frac{\bar{m}}{\Delta m} = 0,05 \left( fL \sqrt{\frac{m}{2V_z}} \right)^2 \quad \text{Gleichung 6}$$

mit: m= Masse  
 $\Delta m$ = Massendifferenz der Ionen  
 f= angelegte Hochfrequenz  
 L= Länge des Quadrupols  
 $V_z$ = Ionenenergie beim Eintritt in den Quadrupolfilter

Für den Quadrupol als Massenanalysator gilt, dass der Abstand zweier Messsignale und deren Signalbreite über den gesamten Messbereich konstant sind und es eine Einheitsmassenauflösung besitzt.

Zur Unterscheidung von z. B.  $\text{N}^{2+}$  (28,0061 amu) und  $\text{CO}^+$  (27,9949 amu) benötigt man bereits eine Auflösung von 2500. Zu den massenspektrometrischen Methoden höherer Auflösung zählen u. a. Flugzeitmassenspektrometer oder doppelfokussierende Sektorfeldgeräte.

**Tabelle 5: Charakteristische Massenauflösungen verschiedener massenspektrometrischer Methoden**

Methode	Auflösung
Quadrupol	10 - 1000 (Einheitsauflösung)
Elektrostatisches Sektorfeld	50
Magnetisches Sektorfeld	5.000
Doppelfokussierendes Sektorfeld	10.000 (100.000)
Flugzeit-Massenspektrometer	5.000 - 60.000
Orbitrap-MS	100.000 - 400.000
Fourier-Transform-Ionenzyklotron-MS	bis 1.000.000

Dabei gelten Peaks nach der 10 % (50 %)-Definition als getrennt, wenn zwei gleich hohe Peaks mit  $\Delta m=1$  in ihren Flächen nicht zu mehr als 10 % (50 %) überlappen.

Die in Tabelle 5 angegebenen Auflösungen werden bei Routineanwendungen verwendet. In der Literatur sind teilweise höhere Auflösungen dokumentiert, da beispielsweise ein doppelfokussierendes Sektorfeld-Gerät unter Verlust der Nachweisstärke auf eine Auflösung von 100.000 optimiert werden kann [CAMMANN 2001, MÜLLER & HEUMANN 2000].

### 2.2.3.2 Flugzeitmassenspektrometrie

Die Flugzeitmassenspektrometrie (TOF-MS, von engl. „*time-of-flight mass spectrometry*“) ist eine weitverbreitete Methode zur Massenbestimmung. Besonders in der Bioanalytik von großen Molekülen wie Proteinen oder DNA-Fragmenten wird diese Methodik angewendet, da ein TOF-MS über einen großen Massenbereich verfügt. Typischerweise ist ein Flugzeitmassenspektrometer mit einer weichen Ionisierungsquelle wie ESI oder MALDI kombiniert. Letztere wird in der Regel wegen der MALDI-typischen Erzeugung von einfach geladenen Ionen und den damit verbundenen großen  $m/z$ -Werten nahezu ausschließlich an einem TOF-MS verwendet.

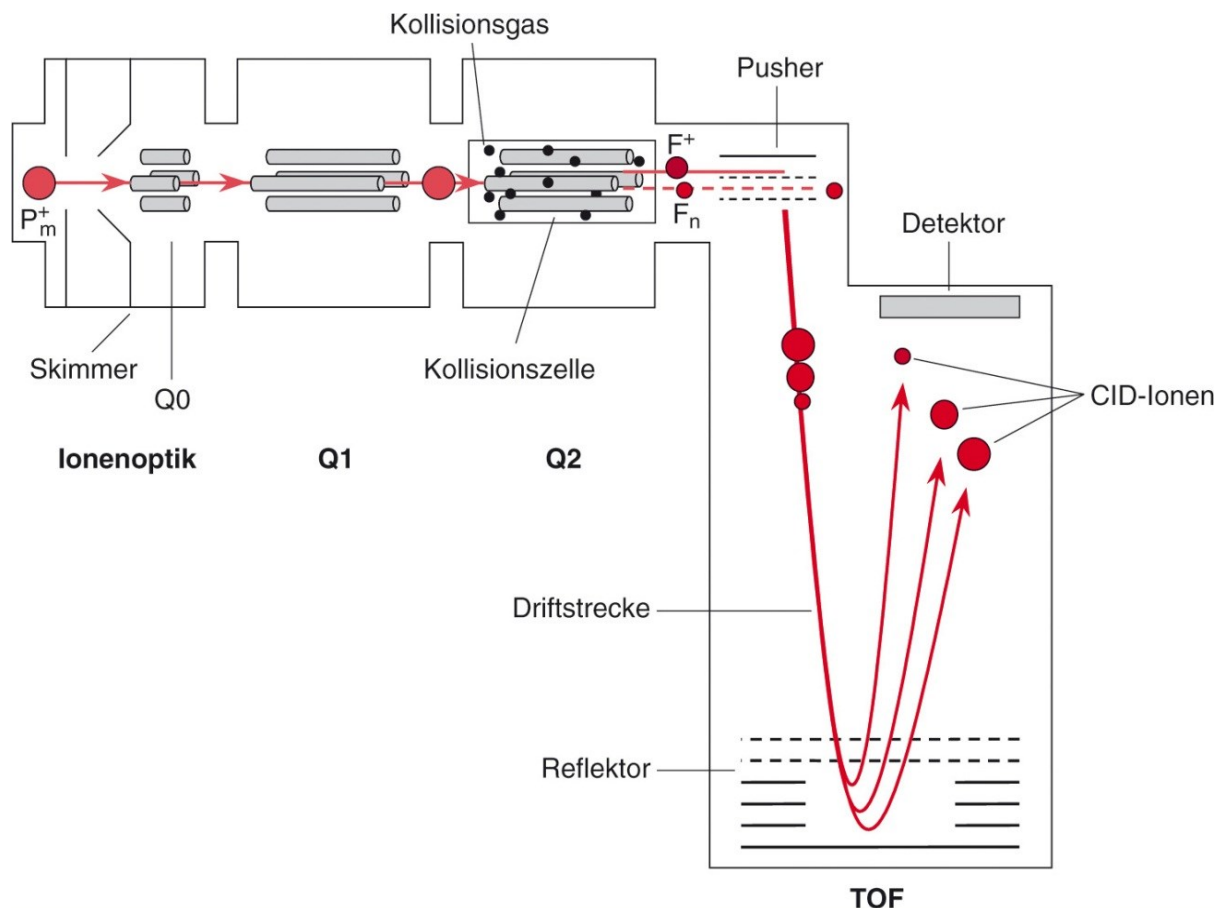


Abb. 21: Schematischer Aufbau eines Quadrupolflugzeitmassenspektrometers. Die Ionen werden durch die Ionenoptik geleitet und fokussiert (Q0). Im Quadrupol Q1 können einzelne  $m/z$ -Werte selektiert oder alle Ionen durchgeleitet werden. Der darauf folgende Q2 kann mit einem Kollisionsgas (Argon, Stickstoff) befüllt werden und zur Fragmentation (CID, von engl. „collision-induced-dissociation“) der in Q1 selektierten Ionen genutzt werden. Anschließend werden die Ionen vom Pusher paketweise ins Flugrohr überführt und ggf. an einem Reflektor zur Verlängerung der Driftstrecke reflektiert. Schließlich werden die einzelnen Ionen an einem Detektor registriert. (Abbildung entnommen aus [LOTTSPREICH & ENGELS 2006]).

Die Trennung der einzelnen Ionen erfolgt bei einem TOF-MS aufgrund unterschiedlicher Driftzeiten in einem feldfreien Flugrohr bedingt durch Unterschiede in Ladung oder Masse des Ions.

Die Beziehung des Masse-zu-Ladung-Verhältnisses zur Flugzeit kann aus der kinetischen Energie eines Körpers und der potentiellen Energie eines Ladungsträgers hergeleitet werden.

Für Energien gilt, dass sie zugleich auf die Ionen wirken:

$$E_{kin} = \frac{1}{2}mv^2 \equiv zeU = E_{pot} \quad \text{Gleichung 7}$$

Mit der Definition, dass die Geschwindigkeit (v) der Quotient aus Weg (l) und Zeit (t) ist, folgt:

$$\frac{1}{2}m\left(\frac{l}{t}\right)^2 = zeU \quad \text{Gleichung 8}$$

Durch Umformen der Gleichung erhält man das Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) in Abhängigkeit von der Zeit:

$$\frac{m}{z} = \frac{2eU}{l^2}t^2 \quad \text{Gleichung 9}$$

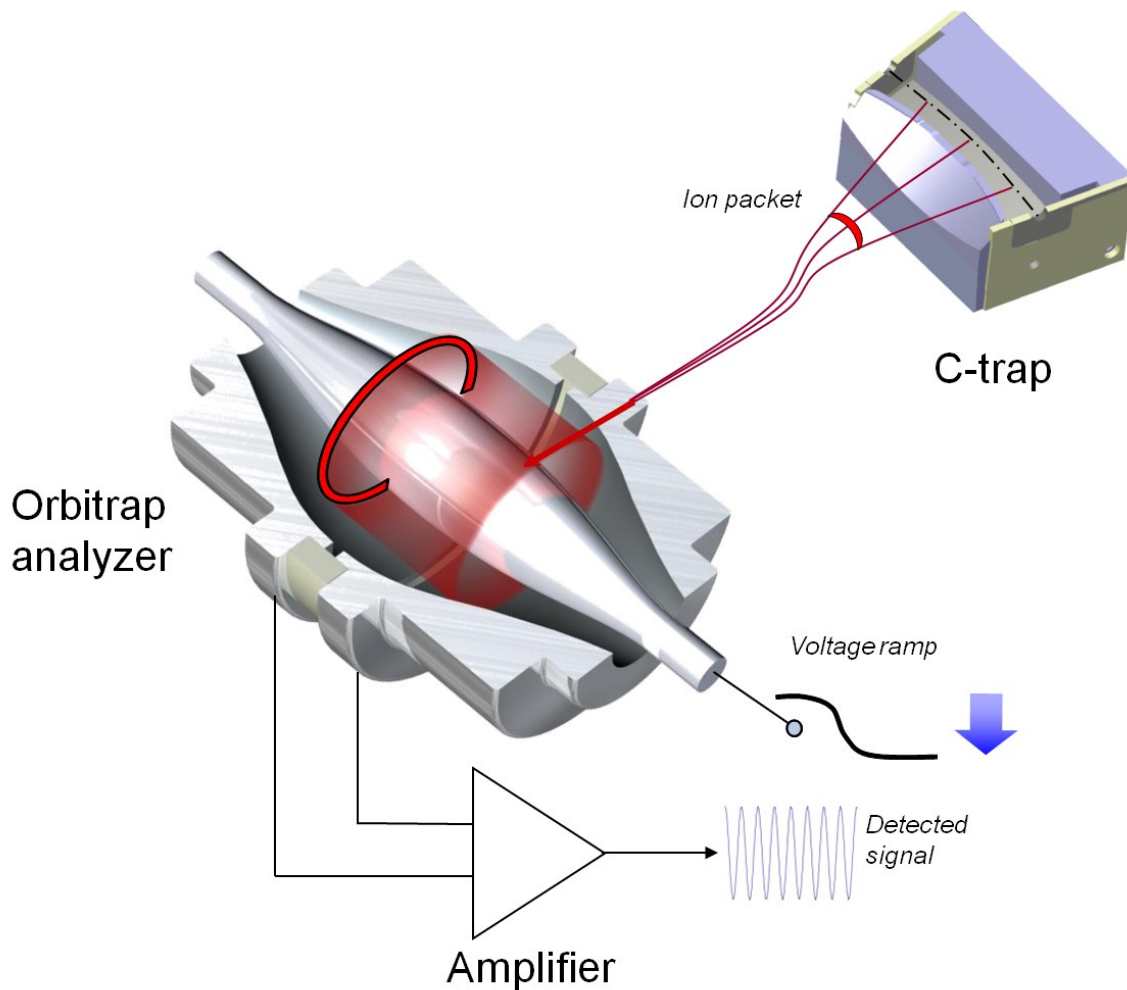
Die Flugrohrlänge (l), Elementarladung (e) und Spannung (U) sind Konstanten oder Geräteparameter und somit bekannt.

### 2.2.3.3 Die Orbitrap

Das Prinzip der Orbitrap wurde im Jahr 2000 von Aleksander Makarov [MAKAROV 2000] erstmals beschrieben. Der spätere Markenname Orbitrap leitet sich dabei aus dem englischen Titel seiner Publikation ab: Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis. Die Technologie ist eine Weiterentwicklung [HU et al. 2005] der Kingdon-Zelle zur Neutralisation von Raumladungseffekten von Elektronen bei der Erzeugung von Kationen [KINGDON 1923], die in den 1980er Jahren von Knight zur Speicherung von Laser-generierten Ionen modifiziert wurde [KNIGHT 1981]. Eine Neuerung ist, dass weder ein RF-Feld noch ein magnetisches Feld zum

Einfangen der Ionen genutzt wird; einzig ein elektrostatisches Feld, welches quadrupolare und logarithmische Potentiale vereint.

Die Funktionsweise der Orbitrap als Massenanalysator beruht auf einem Aufbau, bei dem die Ionen in einer sogenannten C-Trap fokussiert und in Ionenpaketen in den Elektrodenraum geleitet werden. Innerhalb des Elektrodenraums bewegen sich die Ladungsträger auf Kreisbahnen (Orbits) um eine spindelförmige Zentralelektrode. Die Injektion der Ionen in die Orbitrap und die Ausbildung eines stabilen Zustands der Ionen ist ein kritischer Schritt, da geringe Abweichungen in der kinetischen Energie bei Ionen mit identischem Masse-Ladungs-Verhältnis dazu führen können, dass keine stabilen Orbits erreicht werden. Die Aufgabe der bereits erwähnten C-Trap (von engl. curved iontrap), bei der es sich um eine gebogene Quadrupol-Ionenfalle handelt, ist es die Ionen abzukühlen. Das bedeutet die Ionen werden bis zum räumlichen Stillstand abgebremst und fokussiert. Anschließend erfolgt in zeitlichen Abständen  $< 0,3 \mu\text{s}$  eine Überführung der Ionen in die eigentliche Orbitrap, den Elektrodenraum mit der spindelförmigen Zentralelektrode. Nach dem „Einfangen“ der Ionen auf Kreisbahnen oszillieren diese unter Beibehalten ihrer orbitalen Bewegung entlang der Zentralelektrode. Die exakte mathematische Beschreibung dieses Vorgangs ist äußerst komplex und würde den Rahmen dieser Arbeit übersteigen. Daher sei für eine vertiefende Erläuterung auf eine Publikation der Arbeitsgruppe Noll der Purdue University (USA) verwiesen [PERRY et al. 2008].

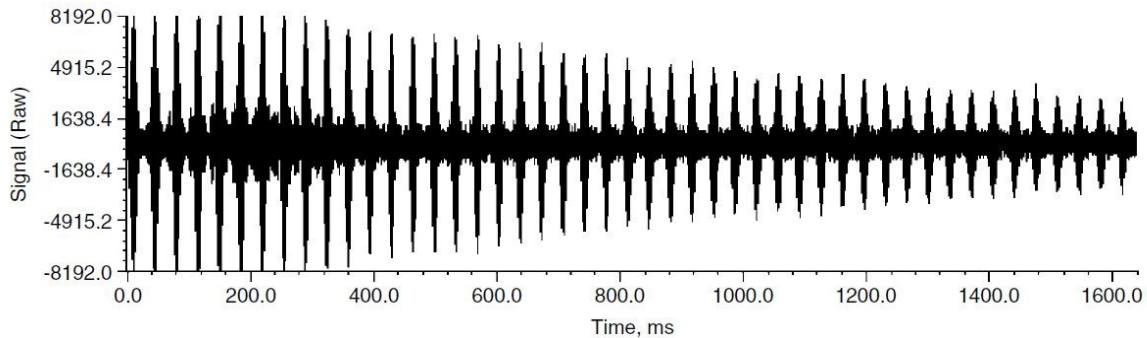


**Abb. 22: Aufbau und Funktionsweise des Orbitrap-Massenanalysators (Abbildung zur Verfügung gestellt von: Thermo Scientific).**

Vereinfacht kann die Bewegung der Ionen wie folgt erklärt werden: Die Injektion der Ionen in die Orbitrap erfolgt kurz nach Einschalten der Spannung der Elektrode, jedoch bevor diese ihre Betriebsspannung erreicht hat. Die Ausbildung der Kreisbahnen erfolgt ohne weiteren Einfluss und wird von Makarov als „Anregung durch Injektion“ („excitation by injection“ [MAKAROV 2000]) bezeichnet. Die Spannungssteigerung durch das Einschalten der Elektrode führt zu einem monotonen Anstieg des elektrischen Feldes, das auf die Ionen wirkt und eine Verkleinerung der Kreisradien erzwingt. Dieser Prozess ist als „elektrodynamisches Verdichten“ („electrodynamic squeezing“ [MAKAROV 2000]) bekannt und bewirkt, dass die Ionen axial oszillieren, um einer Kollision mit der gleichartig geladenen Zentralelektrode zu entgehen. Die



Oszillationen werden über einen definierten Zeitraum registriert und liefern ein transientes Signal, wie in folgender Abbildung dargestellt:



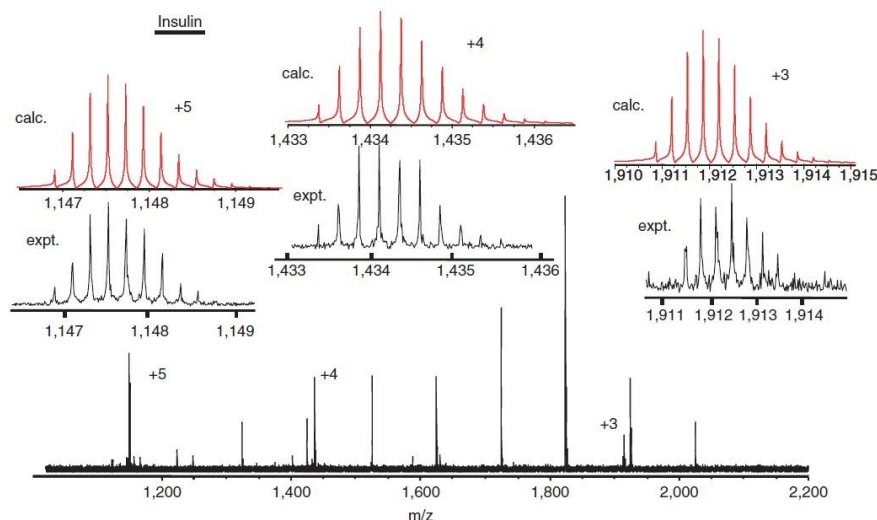
**Abb. 23:** Transient von Insulin in einer Orbitrap-Ionenfalle. Die Differenz zwischen den Ausschlägen entspricht der Dauer für eine Oszillationsbewegung des Ions. (Abbildung entnommen aus: [HU et al. 2005]).

Dieses Signal wird durch Fourier-Transformation in ein Massenspektrum umgewandelt. Wie in Abb. 23 ersichtlich ist, kann die Bewegung der Ionen durch einen harmonischen Oszillator beschrieben werden. Daraus ergibt sich der folgende Zusammenhang:

$$m/z = k\omega^2 \quad \text{Gleichung 10}$$

mit:  $m/z$  = Masse-Ladungsverhältnis  
 $k$  = geräteabhängige Konstante  
 $\omega$  = Frequenz des Oszillators

Beispielsweise liefert die Fourier-Transformation des Transienten aus Abb. 23 das nachfolgende Massenspektrum:



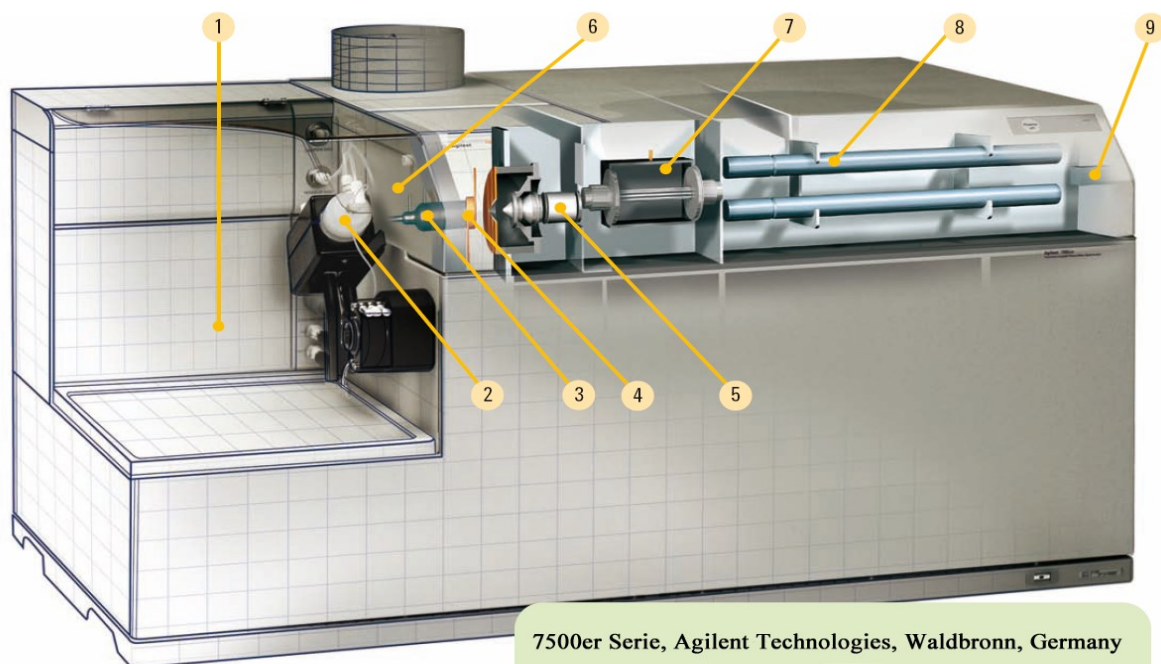
**Abb. 24:** Fouriertransformiertes Signal von Insulin. Die roten Spektren stellen das berechnete Isotopenmuster dar, während die schwarzen Spektren eine Vergrößerung des jeweiligen Ladungszustands zeigen. Aufgenommen wurden 8 Mio Datenpunkte. (Abbildung entnommen aus: [HU et al. 2005]).

Durch die große Anzahl aufgenommener Datenpunkte können für das jeweilige Ion sehr hohe Massenauflösungen ( $R = 240000$  FWHM bei  $m/z = 400$ ) und Massengenauigkeiten (Massenfehler  $<2$  ppm) erreicht werden.

### 2.2.3.4 ICP-MS

Das Induktiv-gekoppelte Plasma-Massenspektrometer (engl. inductively coupled plasma-mass spectrometer, ICP-MS) ist eine nachweisstarke Methode (im Bereich  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  bzw.  $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) der Elementanalytik, bei der die Ionisierung des Analyten durch ein ca. 6000 – 8000 K heißes Argonplasma erfolgt.

Die einzelnen Elemente bzw. Isotope werden quasi-simultan, meist durch einen Quadrupol als Massenfilter selektiert und anschließend detektiert. Ebenso werden nach ICP-Anregung auch Flugrohr- und Sektorfeldgeräte eingesetzt, welche über eine höhere Massenauflösung verfügen.



**Abb. 25: Aufbau eines ICP-MS: (1) Probenstellfläche, (2) Sprühkammer, (3) Torch & RF-Spule, (4) Shield-Torch-System (STS), (5) Interface & Ionenlinsen, (6) Masseflussregler, (7) Oktopol-Reaktionssystem, (8) Hochvakuumbereich mit Quadrupol als Massenanalysator, (9) Detektor (Abbildung zur Verfügung gestellt von Agilent Technologies).**

Der Aufbau des verwendeten ICP-MS (siehe Abb. 25) besteht aus einer Peristaltikpumpe, über die bei Flüssigaufgabe die Probe in eine Sprühkammer überführt wird. Die hier zerstäubte Probe wird in Form kleiner Tropfen durch einen Argongasstrom in die Plasmafackel (engl. Torch) eingetragen und dort in

dem durch Hochfrequenz erzeugten Argonplasma ionisiert. Die erzeugten Ionen passieren den Interface-Bereich, der im Wesentlichen aus zwei Blenden besteht. Die erste Blende, der Sample Cone, stellt den Übergang vom Atmosphärendruck zum Vorvakuum dar. Bei der zweiten Blende, dem Skimmer Cone, erfolgt der Übergang in den Hochvakuumbereich. Anschließend werden die Ionen durch die Ionenlinsen fokussiert und im Quadrupol nach ihrem Masse zu Ladungsverhältnis getrennt. Abschließend werden die Ionen in einem Detektorsystem, das sowohl zur Detektion einzelner durch auftreffende Ionen ausgelöster Ereignisse (Puls-Modus), als auch zur Messung eines durch das Auftreffen vieler Ionen ausgelösten Stromes (Analog-Modus) geeignet ist.

Zur Quantifizierung eines Elementes mit dem ICP-MS ist eine vorangehende Kalibration mit einer definierten Menge eines Standards vor jedem Messzyklus nötig.

### 2.2.3.5 Elektrospray-Ionisation

Bei der Ionisation durch ein Elektrospray (ESI) handelt es sich um eine schonende Ionisierungstechnik, die 1988 von John B. Fenn an der Yale University entwickelt wurde. Zusammen mit Kōichi Tanaka (MALDI) wurde die Arbeit von John Fenn 2002 mit dem Chemienobelpreis „für die Entwicklung von weichen Desorptions-Ionisierungsmethoden zur massenspektrometrischen Analysen von biologischen Makromolekülen“ ausgezeichnet<sup>1</sup>.

Erst durch die schonende Ionisation beim ESI-Prozess wird eine massenspektrometrische Analyse von intakten Peptiden, Proteinen und labilen Komplexen ermöglicht. Zuvor mussten Proteine aufwendig durch die Edman-

---

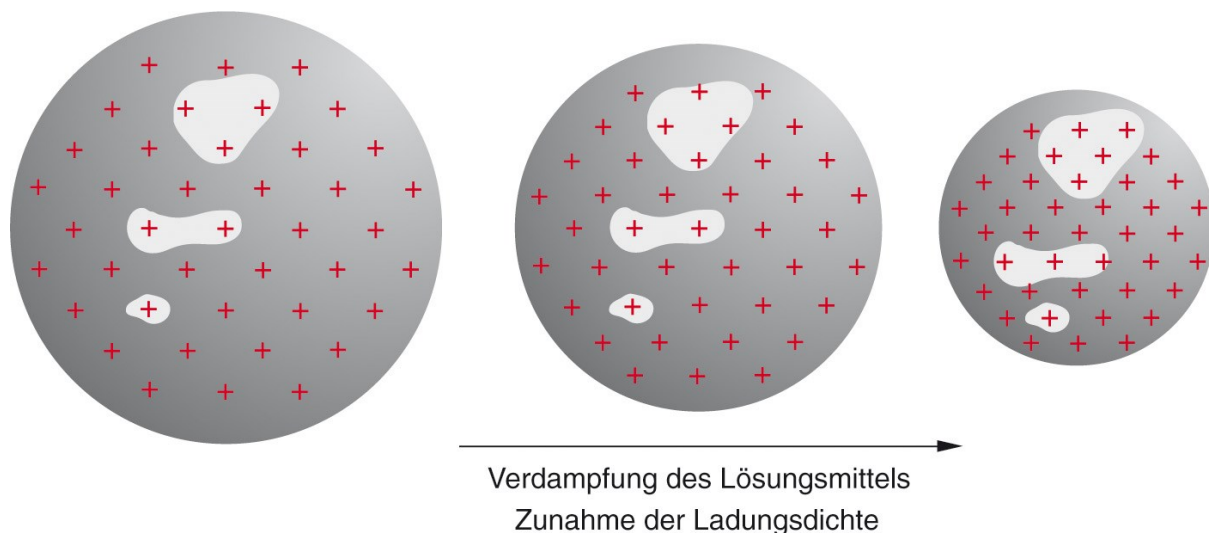
<sup>1</sup> Vgl: "The Nobel Prize in Chemistry 2002". Nobelprize.org. 6 Nov 2012

[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2002/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/)

„The Nobel Prize in Chemistry 2002 was awarded *"for the development of methods for identification and structure analyses of biological macromolecules"* with one half jointly to John B. Fenn and Koichi Tanaka *"for their development of soft desorption ionisation methods for mass spectrometric analyses of biological macromolecules"* and the other half to Kurt Wüthrich [...]"

Sequenzierung analysiert werden [TSCHESCHE & DIETL 1975, VOLLMER et al. 1988].

Auch wenn der ESI-Prozess noch nicht in seiner Gesamtheit verstanden ist, kann die Ionisierung durch Modelle beschrieben werden. Ein allgemein akzeptiertes Modell ist das von Fenn postulierte Ionenemissionsmodell (IEM). Demnach besitzen die Tröpfchen des Elektrosprayprozesses Überschussladungen, die auf der Oberfläche durch Coulomb-Abstoßung eine äquidistante Lage einnehmen. Durch Verdampfung des Lösungsmittels nimmt die Ladungsdichte auf der Tröpfchenoberfläche zu. Die Analytmoleküle übernehmen vor der Ionenemission die Anzahl an Ladungen, die sie aufgrund ihrer räumlichen Ausdehnung unter Berücksichtigung der Coulomb-Abstoßung stabilisieren können [FENN 1993].

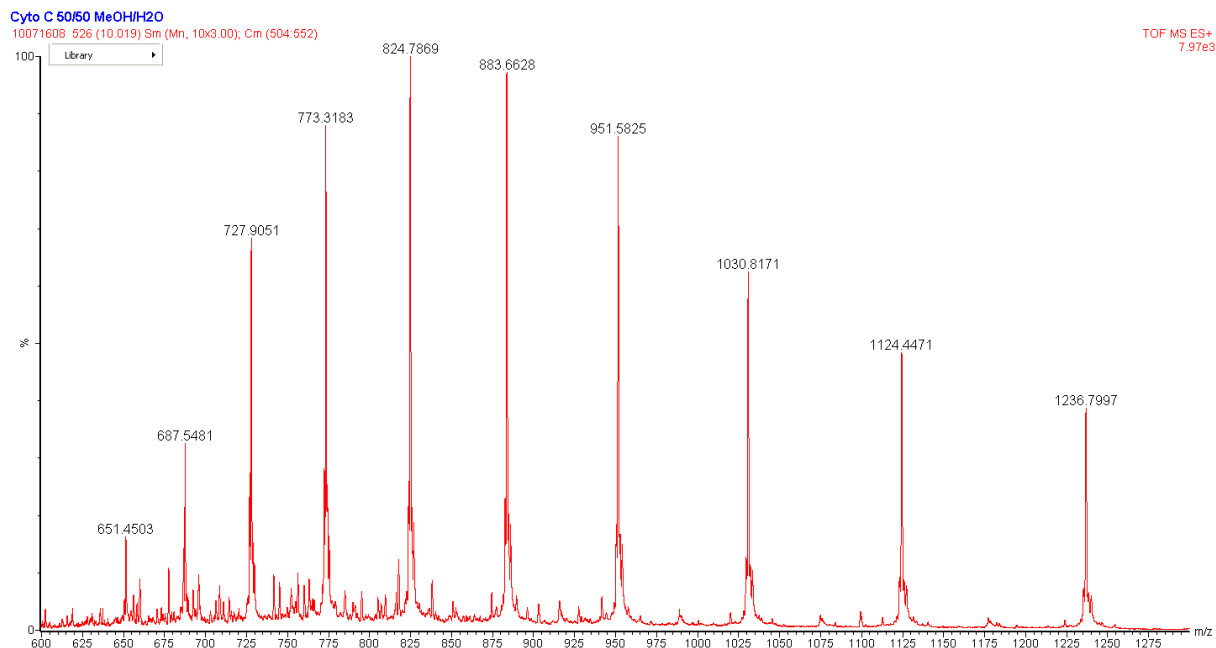


**Abb. 26: Bildliche Darstellung des Ionenemissionsmodells. Die Abstände zwischen den positiven Ladungen (+) verringern sich bei kleiner werdenden Tröpfchenradius. Die Moleküle (hellgrau) im Umfeld der Ladungen übernehmen diese bei einer Emission der Ionen bedingt durch Ladungsabstoßung (entnommen aus [LOTTSPEICH & ENGELS 2006]).**

Ebenfalls hohe Akzeptanz fand das „Charge-Residue“-Modell (CRM, deutsch: Restladungsmodell), das bei der Ionisierung in einem Elektrospray postuliert, die Tröpfchen enthielten im Schnitt ein oder weniger Analytmoleküle und die Ladungen des Tröpfchens würden nach vollständiger Evaporation in der Gasphase vom Analyten übernommen [DOLE et al. 1968]. Dieses Modell konnte

durch Experimente mit vollständig evaporierten Tröpfchen zugunsten des IEM widerlegt werden [NGUYEN & FENN 2007].

In Einklang mit dem Ionisierungsmodell steht die Tatsache, dass beim ESI-Prozess in Abhängigkeit der Molekülgröße die Analyten ein- oder mehrfach ionisiert werden. Dadurch ergibt sich für die ESI eine Verteilung verschiedener Masse-Ladungsverhältnisse für denselben Analyten. Die Verteilung wird aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu einem aufgeschlagenen Briefumschlag auch als „envelope ions“ (deutsch: Briefumschlag-Ionen) bezeichnet.



**Abb. 27: Charakteristischer „Briefumschlag“ bei der Elektrospray-Ionisierung des Proteins Cytochrome C. Es wurde eine 10  $\mu$ M-Proteinlösung in Methanol/Wasser (1:1, v/v) per Fließinjektion aufgegeben.**

Die Molekülmasse des Analyten wird aus den „envelope ions“ berechnet und als Dekonvolution bezeichnet. Dazu sind mathematische Algorithmen in der Massenspektrometrie-Software implementiert. Ein häufig verwendeter Algorithmus ist der der „Maximalen Entropie“ (MaxEnt) [FERRIGE et al. 1992]. Dieser Algorithmus erstellt aus der Gesamtheit der Ionen ein virtuelles Massenspektrum, bei dem sämtliche Analyten ohne Ladung dargestellt werden [ZHANG et al. 1997].

### 2.2.3.6 Kopplungsmethoden zur Elementspeziation

Analytische Methoden, wie die im vorigen Abschnitt beschriebene ICP-MS, dienen in erster Linie zur Gesamtgehaltsbestimmung eines Elementes. Erst durch die Kopplung einer elementselektiven Methode mit der Chromatographie ist es möglich, komplexe analytische Fragestellungen zu bearbeiten und zwischen verschiedenen Verbindungen bzw. Bindungsformen und Oxidationsstufen eines Elements zu differenzieren [Hirner 2006]. Diese Differenzierung bezeichnet man als Elementspeziesanalytik oder Speziation, wodurch es möglich ist, die vorliegende Form des Elements zu identifizieren und so Fragestellungen aus der Medizin, Toxikologie oder der Umwelt beantworten zu können.

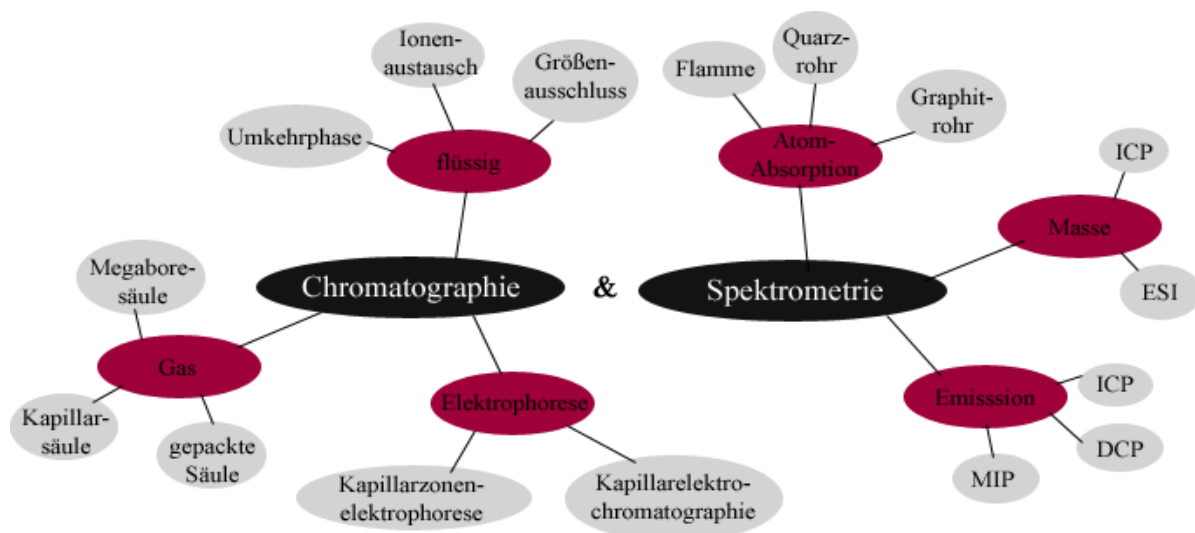
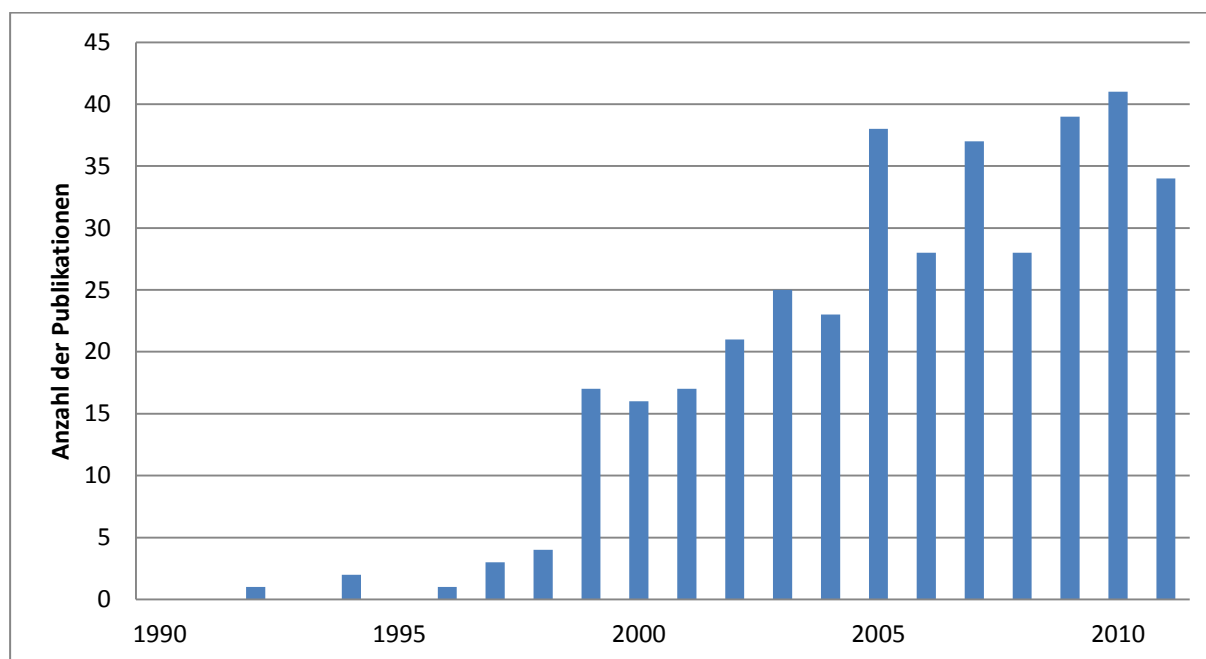


Abb. 28: Schematische Darstellung diverser Kopplungstechniken, die sich in dieser Kombination zur Elementspeziesanalytik eignen (vgl. Cammann 2001).

Die eingesetzten Kopplungstechniken richten sich dabei vollkommen nach der analytischen Fragestellung. So eignet sich für die Bestimmung volatiler Metall(oid)-Spezies besonders die Kopplung der Gaschromatographie mit einem Massenspektrometer, um beispielsweise die Trennleistung der GC mit der niedrigen Nachweisgrenze des ICP-MS zu kombinieren. Ein weiterer Vorteil der Kopplung von chromatographischen Verfahren mit dem ICP-MS ist die Minimierung von Interferenzen, da Matrixbestandteile, die zur

Interferenzbildung führen können, während der Chromatographie vom Analyten getrennt werden.

Zur Untersuchung wässriger Medien eignet sich dahingegen die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC, engl. high performance liquid chromatography). Besonders im Bereich der hochmolekularen Verbindungen, wie Proteine, Peptide, Polymere, usw. wird die HPLC eingesetzt. Neben der Kopplung der HPLC mit dem ICP-MS als nachweisstarken, aber destruktiven Detektor zur Metallproteinidentifizierung und –quantifizierung, wird die HPLC ebenfalls mit der ESI als einer sanften Ionisierungsquelle angewendet. Die Bedeutung der ESI-MS für die Elementspeziation hat in den letzten Jahren deutlich zugenommen, da es auf diese Weise möglich ist den Analyten nahezu fragmentierungsfrei zu ionisieren und anschließend massenspektrometrisch zu identifizieren.



**Abb. 29: Bedeutung des ESI-MS für die Elementspeziation. Die Anzahl der Publikationen wurde aus der Literaturdatenbank „Scopus“ mit dem Suchwörtern „elemental speciation ESI-MS“ ermittelt.**

Zur Elementspeziation werden in der Regel Kopplungen aus Chromatographie oder Elektrophorese und einem elementspezifischen oder molekülselektiven Detektor eingesetzt. Typische Kopplungen sind in folgender Tabelle aufgeführt:

**Tabelle 6: Übersicht über Kopplungsmethoden und ihre typischen Anwendungsbereiche**



Kopplungsmethode	Typische Spezies	ausgewählte Literaturbeispiele
GC/EI-MS	Siloxane, flüchtige Metalloide, Halogene	[FLASSBECK et al. 2001]
GC/ICP-MS	flüchtige Metalloide, Ethylier- und propylierbare Metall(oide) wie z.B. Pb, Sn, Hg, Bi	[FELDMANN et al. 1994]
GC/AFS	Flüchtige As-Spezies	[UROIC et al. 2009]
LC/ESI-MS	Biomolekül-Metall(oid)spezies, wie Se-Aminosäuren, HgGSH-Spezies usw...	[CHASSAIGNE et al. 2000]
LC/ICP-MS	Speziation von As, Hg, Cr, ...	[RABIEH et al. 2008]
CE/ICP-MS	Se-Spezies und Metalloproteine	[SCHRAMMEL et al. 1999]

Bei der Verwendung o.g. Methoden zur Elementspeziation werden die Limitationen der einzelnen Detektoren deutlich. Eine Identifizierung der Elementspezies kann definitiv nur einen Detektor erfolgen, der Strukturinformationen liefert, z.B. EI-MS und ESI-MS. Nachteile der Moleküldetektion sind dagegen in der Regel eine schlechtere Nachweisgrenze, unübersichtliche Chromatogramme bei Analyten in komplexer Matrix (medizinische oder Umweltproben), sowie eine aufwendige Quantifizierung, da Elementspezies in der Regel nicht kommerziell zur externen Kalibrierung erhältlich sind.

Im Gegensatz dazu bietet die Elementdetektion z.B. mittels AAS, ICP-OES, oder ICP-MS bessere Nachweisgrenzen in der Elementspeziation, sowie übersichtliche Chromatogramme und eine speziesunabhängige Quantifizierbarkeit. Eine Identifizierung der Spezies ist jedoch nur bedingt über Retentionszeitabgleich oder Siedepunktskorrelation (GC) möglich. Ein Problem bei dieser Vorgehensweise stellt die Möglichkeit einer Fehlidentifikation durch koeluierende Spezies des Elements, bzw. eine falsch-positive Identifizierung aufgrund identischer Retentionszeit anderer, unbekannter Spezies dar. Weiterhin muss oft eine Umwandlung der Spezies in eine Form erfolgen, die eine



Trennung vor der Detektion ermöglicht, was jedoch in der Regel zu einem Informationsverlust über die ursprüngliche Spezies führt.

Die o.g. Limitationen sollen im Folgenden aufgrund der Relevanz für diese Arbeit am Beispiel von LC/ESI-MS und LC/ICP-MS erläutert werden. Die Kopplung von Flüssigchromatographie und Elektrospray-Massenspektrometrie eignet sich im Allgemeinen zum Screening auf unbekannte Verbindungen, sowie zur Analytquantifizierung. Die Detektion unbekannter Verbindungen wird jedoch besonders bei geringen Konzentrationen in der hochauflösenden Massenspektrometrie erschwert, da Spuren einer Verbindung bei der großen Anzahl der detektierten Ionen kein signifikantes Signal im Totalionenstrom erzeugen. Zur Quantifizierung muss für jede Verbindung eine Kalibration erfolgen. Dazu ist es notwendig, dass die Verbindung in hoher Reinheit verfügbar ist, was häufig bei Elementspezies nicht gegeben ist oder nur durch großen Aufwand (z.B. Synthese von toxischen und instabilen Spezies) erreicht werden kann.

Andererseits ist die LC/ICP-MS-Kopplung sehr selektiv und nachweisstark und kann somit geringste Mengen einer Elementspezies selbst in komplexen Gemischen nachweisen. Ebenso ist die Quantifizierung mittels externer Kalibration unter Verwendung von Metallstandardlösungen möglich, da bei der Ionisierung im Plasma des ICP-MS in erster Näherung keine Speziesabhängigkeit besteht. Fehlende Strukturinformationen führen dazu, dass mittels LC/ICP-MS allein eine Identifizierung von unbekannten Elementspezies nicht möglich ist, sowie bei einem Retentionszeitabgleich die Gefahr der fehlerhaften Spezieszuordnung besteht.

### **2.2.3.7 Parallele Molekül- und Elementdetektion nach chromatographischer Trennung in der Elementspeziesanalytik**

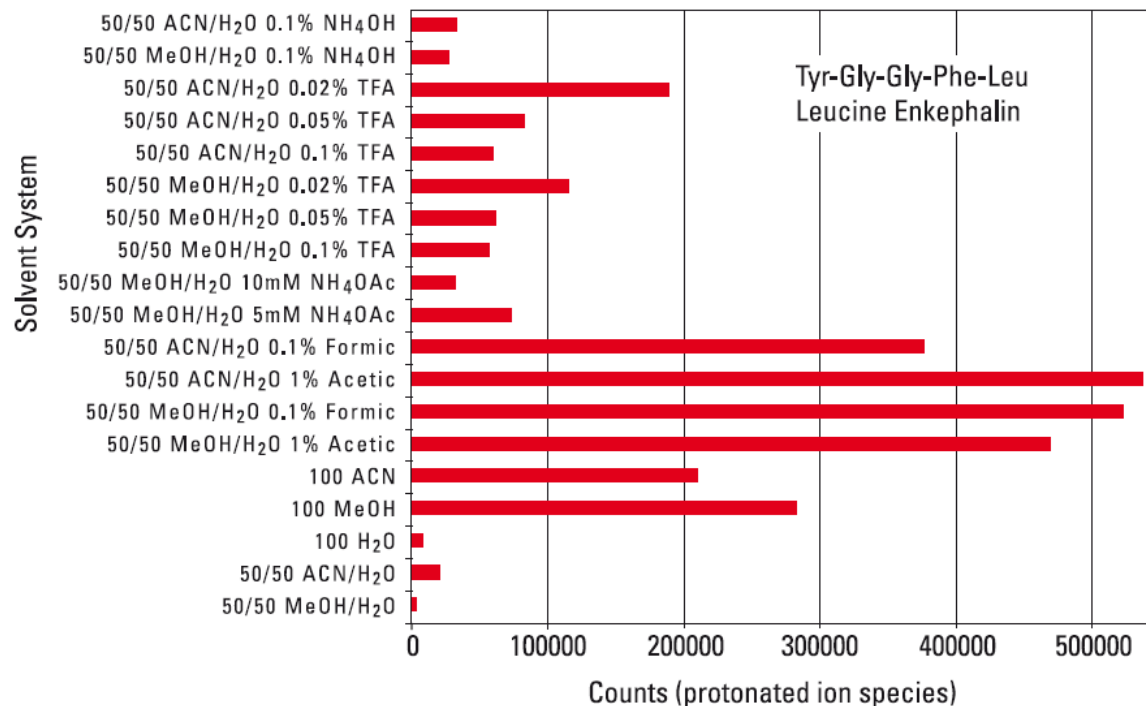
Ein Grundprinzip der Elementspeziesanalytik ist die Kombination von Element- und Molekülmassenspektrometrie nach flüssig- oder gaschromatographischer

Trennung. Dabei kann die Detektion entweder „offline“, d.h. durch nacheinander durchgeführte Analysen unter konstanten chromatographischen Bedingungen bei Verwendung unterschiedlicher Detektoren durchgeführt werden, oder zum anderen durch eine gleichzeitige „online“-Kopplung der komplementären Detektortypen an das Trennsystem. Letztere Möglichkeit hat neben der Zeitersparnis vor allem den Vorteil, dass identische Teilproben untersucht werden und somit Fehler und Kontaminationen bei der Probenaliquotierung ausgeschlossen werden können. Auch spielen zeitliche Effekte, wie beispielsweise eine Probendegradation des verbleibenden Aliquots während der ersten Messung keine Rolle.

Für die Speziationsanalytik volatiler Verbindungen ist die GC/EI-MS/ICP-MS-online-Kopplung eine etablierte Methode [KÖSTERS et al. 2005, DIAZ-BONE et al. 2009, HOLLMANN et al. 2010]. Die Realisierung erfolgt über einen Split des Efflux nach der Säule, so dass ein Teil des Volumenstroms in das EI-MS und der Rest in die ICP-MS geleitet wird. Beim ICP-MS wird gleichzeitig eine Elementstandardlösung aufgegeben, die einerseits für ein „feuchtes“ Plasma und konstantere Ionisierungsbedingungen sorgt und andererseits zur Quantifizierung mittels Interelement-Interaggregat-Kalibration (IIK) benötigt wird [FELDMANN 1997].

Ein Transfer dieser parallelen Molekül- und Elementdetektion nach flüssigchromatographischer Trennung ist nicht ohne weiteres möglich. Die Schwierigkeit liegt in den unterschiedlichen Laufmittelanforderungen der Ionenquellen. Während das ICP-MS eine hohe Matrixtoleranz gegenüber Ionen (z. B. Puffer) aufweist, führen geladene Teilchen in der ESI zu einer Ionensuppression [MALLET et al. 2004]. Außerdem ist die Toleranz gegenüber nicht-volatilen Puffern bei der ESI-Quelle deutlich geringer [MALLET et al. 2004] als bei dem ICP-MS, da diese koagulieren und als Feststoff die feinen Kapillare in der Quelle verstopfen können.

Ein weiterer Fallstrick bei paralleler ESI-MS und ICP-MS Detektion ist das unterschiedliche Ionisierungsverhalten der beiden Ionisationsmethoden in Bezug auf organische Lösemittel. Eine effiziente Ionisierung bei der ESI benötigt einen gewissen Anteil an Organik in der mobilen Phase, damit es zu einer Entfaltung der Moleküle kommt und Ladungen besser stabilisiert werden können [LOO et al. 1991].



**Abb. 30: Einfluss der mobilen Phase auf die positive Elektrospray Ionisierung. Ideal sind mobile Phasen, die neben einem organischen Anteil auch eine schwache Säure beinhalten. (Abbildung entnommen aus [THERMO SCIENTIFIC CORPORATION 2004a]).**

Im Gegensatz dazu beeinflussen organische Lösemittel wie Methanol oder Acetonitril negativ die Ionenerzeugung in der ICP-Quelle. Dieses gilt für einen parallelen Ansatz gleichermaßen wie für sequentielle LC/ESI-MS und LC/ICP-MS Läufe. Zwar kann man auf Kosten der Signalintensität das Plasma während des Tuningprozesses stabilisieren, jedoch nur für isokratische Laufmittelzusammensetzungen. Für die Gradientenelution ist diese Einstellung nicht möglich.

Zur Vermeidung dieser Problematik gibt es unterschiedliche Ansätze:

- 1) Unter Verwendung einer zweiten LC-Pumpe wird ein sogenannter „reversed gradient“ (engl. für „umgekehrter Gradient“) mit dem Gradienten aus der ersten LC-Pumpe vor Erreichen des ICP-MS vermischt. Die Gradienten verhalten sich bei diesem Ansatz wie Bild und Spiegelbild zueinander. Dadurch kommt es zu einer quasi-isokratischen Elution, weil die Gesamtzusammensetzung der mobilen Phase konstant ist [GREBE et al. 2011].
- 2) Die Ionisierung eines Element wird in Abhängigkeit der Zeit (und folglich der Laufmittelzusammensetzung) für den gewählten Gradienten ermittelt und durch eine mathematische Funktion genähert. Mit Kenntnis der Laufmittelabhängigkeit des Elementsignals können bei der Quantifizierung die Flächenintegrale korrigiert werden [SIETHOFF et al. 1999], [AMAYO et al. 2011].
- 3) Eine Miniaturisierung der Chromatographieanlage hin zu Flüssen in den Mikro- oder Nanoliterbereich in Kombination mit einer Verdünnung durch einen kontinuierlich aufgegebenen ICP-MS-Standard führt zu einem geringeren Einfluss auf die Ionisierung [WIND et al. 2001].
- 4) Eine Membran trennt die organischen Moleküle vor Eintritt in das Plasma ab und verhindert die Beeinflussung der Ionisierung [BLUEMLEIN et al. 2008a]
- 5) Die Zugabe von Sauerstoff in das Plasma führt zu einer Verbrennung der organischen Moleküle und verhindert somit eine laufmittelbedingte Signalveränderung in dem ICP-MS [BLUEMLEIN et al. 2008a].

Trotz der oben genannten Hinderlichkeiten ist der komplementäre Einsatz von ICP-MS und ESI-MS in der Fachliteratur bereits dokumentiert. Die Kombination geschieht normalerweise sequentiell, d.h. es werden nacheinander ein LC/ESI-MS und ein LC/ICP-MS-Lauf durchgeführt und die Daten im

Anschluss korreliert [SIETHOFF et al. 1999, NISCHWITZ et al. 2003, EDLER et al. 2006].

Die Arbeitsgruppe Feldmann aus Aberdeen in Schottland hat eine LC/ESI-MS/ICP-MS online-Kopplung realisiert [BLUEMLEIN et al. 2008a, BLUEMLEIN et al. 2008b, KRUPP et al. 2008]. Die technische Umsetzung erfolgt durch ein T-Stück, das als Nachsäulensplit den Efflux der LC teilt. Dieser Fluss wird dann parallel zu ESI-MS (80 %) und ICP-MS (20 %) weitergeleitet.

### **3. Methoden und instrumentelle Entwicklung**

Nachfolgendes Kapitel 3 beschreibt das praktische Vorgehen bei Probennahme, Probenvorbereitung und Methodenentwicklung. Außerdem beinhaltet dieser Abschnitt eine Übersicht über die verwendeten Labormaterialien, Reagenzien, Gase und Geräte.

Außerdem werden die Vorüberlegungen zur instrumentellen Entwicklung einer LC/ESI-MS/ICP-MS-Kopplungsapparatur, sowie deren Realisierung und Funktionsprinzip beschrieben.

#### **3.1 Probenvorbereitung**

##### **3.1.1 Muschelernte**

Die Muscheln zur Inkubation mit PGEs wurden im Fluss Stever, der den Halterner Stausee mit dem Hullerner Stausee verbindet, in Haltern am See (Nordrhein-Westfalen) geerntet (Siehe Karte im Anhang auf Seite 139). Dazu wurden mit Muscheln bewachsene Steine aus dem Wasserlauf entfernt und die Muscheln vorsichtig unter Erhalt der Byssus-Fäden ohne Zerstörung der Schale von der Oberfläche des Steins gelöst. Zur besseren Vergleichbarkeit der geplanten Versuche wurde darauf geachtet, nur Tiere mit einer Länge von 20 – 25 mm einzusammeln. Der Transport der Muscheln zur Universität Duisburg-Essen erfolgte in Behältern, die mit Wasser aus dem Lebensraum der Tiere gefüllt waren. Die Muscheln wurden während der Fahrt mittels Kompressor mit Sauerstoff versorgt. In Essen wurde das Bachwasser entfernt, die Muscheln gewaschen und in die von der AG Sures betriebenen Aquarien überführt. Dort fand nach einer Gewöhnungsphase die Exposition mit Platin und Palladium statt.

### 3.1.2 Extraktion individueller Muscheln zur Speziesanalytik

Zur Homogenisation des Muschelgewebes und Extraktion der PGE-Spezies wird die SpeedMill verwendet.

Dabei wird folgender Ablauf eingehalten:

1. Die Muscheln werden im gefrorenen Zustand und in Inertatmosphäre in der Glovebox von ihren Schalen befreit.
2. Das Weichgewebe wird ebenfalls unter Luftausschluss in die Lysistubes eingewogen und verschlossen.
3. Anschließend werden die Gefäße in die SpeedMill unter Verwendung eines gekühlten Einsatzes (-80 °C) überführt und der Inhalt durch 20 sekundigen Betrieb der SpeedMill homogenisiert.
4. Die Lysistubes werden abermals in der Glovebox unter Luftausschluss geöffnet und 500 µl HEPES-Puffer (0,4 M, pH 7,4) zugegeben.
5. Darauf folgt die Extraktion der PGE-Spezies, indem die Tubes in der passiv-gekühlten (-80 °C) SpeedMill folgendem Extraktionsprogramm unterzogen werden: Es werden drei Zyklen bestehend aus 30 Sekunden Aufschluss gefolgt von einer 60 sekundigen Pause zum erneuten Abkühlen des Homogenisats verwendet.
6. Nach Ablauf des Programms werden die Gefäße 5 min bei 14.500 Umdrehungen in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert.
7. Abschließend wird das Extrakt unter Inertbedingungen in der Glovebox in Glasvials überführt. Die Proben werden im Anschluss in den auf 4 °C temperierten Autosampler überführt und danach vermessen.



**Abb. 31: Analytik Jena SpeedMill (links) und der zugehörige Lysis-Tube mit Keramikugeln befüllt (rechts).**

### 3.1.3 Mikrowellendruckaufschluss von Muschelgewebe

Vor der Durchführung des Aufschlusses werden die Aufschlussgefäße und die Messkolben gereinigt. Nachdem diese in 5%-iger  $\text{HNO}_3$  vorgereinigt, mit Reinstwasser gespült und im Trockenschrank über Nacht getrocknet worden sind, werden die Messkolben für 24 Stunden mit konzentrierter Salpetersäure (Reinheit: doppelt subboiled) ausgedampft, darauf mit Reinstwasser gespült und im Trockenschrank getrocknet.

Die Mikrowellengefäße aus Teflon werden mit 8 mL  $\text{HNO}_3$  und 4 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  befüllt, 4-5 Siedesteine zugegeben und verschlossen. Daraufhin wird ein Reinigungsprogramm der Mikrowelle durchgeführt. Nach Ablauf des Programms und Abkühlen der Gefäße auf Raumtemperatur wird der Inhalt verworfen und die Prozedur wiederholt. Nach zweimaliger Reinigung können die Mikrowellengefäße zur Metallanalytik verwendet werden.

Dazu wird das Aufschlussprotokoll der Arbeitsgruppe Sures verwendet.

- Maximal 300 mg Gewebe (FS) bzw. 200 mg Muschelweichgewebe (TS) wird in das Teflongefäß eingewogen. Anschließend wird 1,3 ml  $\text{HNO}_3$  (65%, suprapur oder subboiled) und 2,5 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%, suprapur) zugegeben.
- Die Proben werden unter Verwendung des folgenden, druckgesteuerten Mikrowellenprogramms aufgeschlossen:

**Tabelle 7: Aufschlussprogramm der Mikrowelle für Muschelgewebe**

Schritt	1	2	3	4	5
Leistung [%] <sup>1</sup>	100	100	100	100	0
Druck [bar] <sup>2</sup>	2,48	4,96	5,99	6,95	0,96
Rampe [min] <sup>3</sup>	10	10	15	25	30
Haltezeit [min] <sup>4</sup>	5	5	7	20	0

- Nach dem Aufschluss wird die Probelösung in 5 mL-Glasmesskolben überführt und mit Reinstwasser bis zur Eichmarkierung aufgefüllt. Der



Messkolben wird mit einem Stopfen verschlossen und im Anschluss umgehend an dem ICP-MS gemessen.

### 3.1.4 Mikrowellendruckaufschluss von BCR-723

Für PGE in der Matrix Muschelweichgewebe ist kein zertifiziertes Referenzmaterial (CRM) verfügbar. Der einzig vorliegende zertifizierte Referenzstandard BCR-723 (BRC, frz. für „Bureau Communautaire de Références“) beinhaltet die PGE Rhodium, Palladium und Platin in Straßenstaub. Die Vorbereitung des Aufschlusses und die verwendeten Materialien sind analog zum Aufschluss des Muschelweichgewebes.

Zur Methodenevaluierung werden zwischen 100 mg und 150 mg des Straßenstaubs eingewogen, nachdem das Vorratsgefäß 5 Minuten manuell homogenisiert wurde. Danach erfolgt der Aufschluss in Anlehnung an das Protokoll der Arbeitsgruppe Perämäki [NIEMELÄ et al. 2005]. Der Aufschluss erfolgt unter Verwendung von Teflongefäßen in einem Zwei-Stufen-Prozess und ist in folgender Tabelle zusammengefasst:

**Tabelle 8: Bedingungen des Mikrowellenaufschlusses für das Referenzmaterial BCR-723**

Stufe 1		Stufe 2	
Reagentien	5 mL HNO <sub>3</sub> 3 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Reagentien	3,5 mL HCl 0,1 mL HF
Aufschluss- bedingungen		Aufschluss- bedingungen	
Rampenzeit [min]	10	Rampenzeit [min]	15
Temperatur [°C]	180	Temperatur [°C]	220
Haltezeit [min]	10	Haltezeit [min]	10

Danach wird der Inhalt in 10-mL-Messkolben überführt und mit Reinstwasser bis zur Eichmarke aufgefüllt. Die Proben werden im Anschluss an dem ICP-MS gemessen.

## 3.2 Spezies-Analytik

### 3.2.1 PGE-Spezies Analytik

Als für die Fragestellung der PGE-Speziesanalytik optimale Methode hat sich die Größenausschlusschromatographie mit folgenden Parametern herausgestellt: Zur Trennung wurde eine BioBasic SEC (5 µm; 300 x 4,6 mm Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, U.S.A) mit einer Flussrate von 0,4 mL/min bei einer Temperatur von 30°C verwendet. Die mobile Phase setzt sich zusammen aus Solvens A: 0,1 % Ameisensäure in Reinstwasser (v/v) und Solvens B: 0,1 % Ameisensäure in Methanol (v/v). Die Elution erfolgt isokratisch über 30 Minuten. Das Injektionsvolumen beträgt 10 µL.

Der instrumentelle Aufbau ist auf Seite 88 in Abb. 40 abgebildet.

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass ein Vergleich zu anderen stationären Phasen und unterschiedlichen Parametern durchgeführt wurde und in den Arbeiten von Michalski und Gwosdz [MICHALSKI 2010, MICHALSKI 2011, GWOSDZ 2012] nachgelesen werden kann.

In nachfolgender Tabelle sind die Parameter des ESI-MS und des ICP-MS dargestellt.

Tabelle 9: Übersicht der verwendeten ICP-MS und ESI-MS Parameter

ESI-Orbitrap-MS	Polarität	positive
	Auflösung	100.000 FWHM
	Flussrate <i>Sheath</i> -Gas	30 AU
	Flussrate Hilfsgas	5 AU
	Flussrate <i>sweep</i> -Gas	1 AU
	Spray-Spannung	3,7 kV
	Kapillartemperatur	275°C
	Kapillarspannung	37,5 V
	Spannung <i>tube lense</i>	190 V
	Spannung Skimmer	18 V
TMD-ICP-MS	RF Power	1540 W
	RF Matching	1,7 V
	Nebulizerpumpe	0,08 rps
	Desolvatationsgas (Argon)	70 - 90 AU
	<i>Sample depth</i>	5,6 - 7,2 mm
	Flussrate <i>Carrier</i> -Gas	1,45 - 1,95 L/min
	Flussrate <i>make-up</i> -Gas	0,70- 1,50 L/min
	Spannung Extraktionslinse 1	(-94,7) – (-125,2) V
	Spannung Extraktionslinse 2	(-166,5) – (-187) V
	Detektierte Massen	<sup>34</sup> S, <sup>48</sup> SO, <sup>54</sup> Fe, <sup>63</sup> Cu, <sup>64</sup> Zn, <sup>65</sup> Cu, <sup>66</sup> Zn, <sup>82</sup> Se, <sup>89</sup> Y, <sup>90</sup> Zr, <sup>91</sup> Zr, <sup>103</sup> Rh, <sup>105</sup> Pd, <sup>106</sup> Pd, <sup>107</sup> Ag, <sup>108</sup> Pd, <sup>111</sup> Cd, <sup>115</sup> In, <sup>178</sup> Hf, <sup>194</sup> Pt, <sup>195</sup> Pt, <sup>196</sup> Pt, <sup>202</sup> Hg

Das ESI-MS wurde zu Anfang eines jeden Messtages durch die automatische Softwareprozedur der Gerätesteuersoftware auf Intensität und Massengenauigkeit kalibriert.

Das ICP-MS wurde täglich hinsichtlich maximaler Intensität gemäß dem Protokoll des Herstellers optimiert. Aufgrund der Modifikation des Gerätes mussten die Herstellervorgaben bezüglich der Flussraten für „make-up“ und

„carrier“ Gas angepasst werden. Typische Werte für ein unmodifiziertes ICP-MS sind 0,4 L/min für das „make-up“ und 0,8 L/min für das „carrier“ Gas.

### **3.2.2 Zink-Analytik**

#### **Darstellung von ZnGSH**

Unter Ausschluss von Sauerstoff wird zu 2 mL einer 10  $\mu$ M Zink-Lösung (aus  $\text{ZnCl}_2$ ) ein identisches Volumen einer 10  $\mu$ M Glutathion-Lösung zugegeben. Die Isolation der Verbindung geschieht durch chromatographische Aufreinigung und anschließender 24 stündiger Kryotrocknung.

Ein identischer Ansatz mit einer Zn-Glutathion-Stöchiometrie von 1:2 wurde angesetzt, um die Bildung eines potentiellen  $\text{ZnGSH}_2$ -Komplexes zu überprüfen.

#### **Durchführung der Charakterisierung von ZnGSH**

Die Identifizierung erfolgt mittels FT-IR-Spektroskopie und ESI-Massenspektrometrie. Dabei dient die IR-Spektroskopie in erster Linie der Bestätigung der Schwefel-Zink-Bindung.

Dazu wurde die isolierte Verbindung in einem Wasser/ACN-Gemisch gelöst und in einer finalen Konzentration von 10  $\mu$ mol/L über eine Spritzenpumpe per Fließinjektion direkt in die ESI-Quelle überführt.

Komplementäre Informationen wurden durch FT-IR-Spektroskopie erhalten. Dazu wurden 5 Spatel KBr mit einem Kristall ZnGSH in einem Achatmörser homogenisiert und anschließend in einen Pressling überführt. Gegen einen frisch hergestellten KBr-Referenzpressling wird das ZnGSH Schwingungsspektrum aufgenommen.

#### **Zink-Plasmid-Assays**

Ringförmige Plasmid-DNA wird gegen verschiedene Zn/GSH-Systeme exponiert. Die Assays wurden gemeinsam mit Beatrix Amann aus der Arbeitsgruppe Mikrobiologie I (AG Prof. Hensel) durchgeführt. Dazu wurde mit

Hilfe eines Plasmid-Extraktionskits (QIAGEN Plasmid Midi Kit, Qiagen, Hilden) das zyklische Plasmid p5482 (33.038 Basenpaare) aus dem Bakterium *Bacteroides thetaiotaomicron* isoliert und aufgereinigt. Danach wurden 250 ng Plasmid gelöst in 2 µL Wasser vorgelegt und auf ein Volumen von 10 µL gemäß Tabelle 10 aufgefüllt. Die Konzentration von GSH und Zink (aus ZnCl<sub>2</sub>) betrug 10 mmol/L.

**Tabelle 10: Pipettierschema des Plasmid-Assays**

Probe	GSH-Lösung [µl]	Zn-Lösung [µl]	Wasser [µl]
1	4	0	4
2	0	4	4
3	4	4	0
4	2	4	2
5	4	2	2

Darauf folgend wurden die Lösungen für 1 h bei 37 °C inkubiert und das Auftreten von Einzel- und Doppelstrangbrüchen mittels Agarose-Gelelektrophorese bestimmt. Die Elektrophoresebedingungen waren dabei wie folgt:

Das Probenvolumen wurde mit Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) auf 45 µL gebracht und mit 5 µL einer Lösung bestehend aus 0,05 % Bromphenolblau und 50 % Saccharose aufgefüllt. Mit dieser Mischung wurden 1%ige Agarose-Gele befüllt, die 0,5 µg/mL Ethidium Bromid enthalten. Die Elektrophorese erfolgte für 2-3 h bei einer konstanten Spannung von 50 V.

### **3.2.3 Analytische Bestimmung von oxidiertem und reduzierten Glutathion**

#### **Probenvorbereitung**

Reale Blutproben wurden mit verschiedenen Konzentrationen von GSH und GSSG versetzt, um anschließend über das Standardadditionsverfahren Aussagen über die Konzentration von GSH und GSSG im Plasma und Vollblut treffen zu können. Proteine wurden durch Zugabe von Trifluoressigsäure (TFA) ausgefällt. Durch anschließendes Zentrifugieren erhält man den proteinfreien Überstand.

Alle Arbeiten an offenen Gefäßen wurden in einer Glovebox unter Schutzgas durchgeführt und die Gefäße vor dem Verschließen ebenfalls mit Schutzgas geflutet.

### **Standardadditionverfahren zur Bestimmung von GSH und GSSG in Blutplasma**

Eine Plasmaspende des Universitätsklinikums Essen Probe wird 1:1 (v/v) jeweils mit einem Standard bestehend aus GSH und GSSG in verschiedenen Konzentrationen versetzt (siehe Tabelle rechts).

Die Proteinfällung erfolgt gemäß des Protokolls von Jiang et al. [JIANG et al. 2004]. Zusammengefasst wird eine Proteinfällung mittels gekühltem Aceton bei 0 °C durchgeführt und der Proteinniederschlag durch Zentrifugation abgetrennt. Im Anschluss wird der Überstand sofort analysiert.

Tabelle 11: GSH und GSSG-Konzentrationen

Konzentrationen GSH und GSSG (mmol/L)
0
0,01
0,05
0,1
0,5
1
5

### **Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32645 für GSH und GSSG**

Die Bestimmung erfolgt gemäß DIN 32645 aus der Steigung der Kalibrationsgeraden. Dazu werden separate Lösungen für GSH und GSSG in den Konzentrationen 0; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2; 3; 5; 10 µmol/L angesetzt und mittels LC/MS quantifiziert. Die Messungen erfolgen als Triplikat.

### **Chromatographische Bedingungen**

Zur Trennung wurde eine Hypercarb-Säule (3 µm; 50 x 2,1 mm Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, U.S.A) mit einer Flussrate von 0,2 mL/min bei einer Temperatur von 50°C verwendet. Die mobile Phase setzt sich zusammen aus Solvens A: 0,1 % Ameisensäure in ACN (v/v) und Solvens B: 0,1 % Ameisensäure in Reinstwasser (v/v). Der Verlauf des Gradienten war wie folgt: 0,0 min für 2,0 min 0 % B, von 2,0 min in 4 min Anstieg von 0 auf 100 % B, dann 2,0 min 100% B, in 0,1 min auf 0 % B bis 9 min.

Das Injektionsvolumen betrug 0,5 µL.

### 3.3 Gesamtmetallanalytik

#### 3.3.1 ICP-MS basierte PGE-Analytik ohne Matrixabtrennung

Die quantitative Bestimmung von Platingruppenelementen ist mit vielen Methoden der Elementanalytik nur schwer oder unzureichende möglich, besonders im Bereich der Spuren- und Ultraspurenanalytik. Analytische Verfahren wie AAS oder ICP-OES sind bei umweltrelevanten Konzentrationen durch ihre Nachweisgrenze (NWG) limitiert. Die in der Regel nachweisstarke Konzentrationsanalytik mittels ICP-MS kann nicht ohne weiteres zur PGE-Quantifizierung herangezogen werden, da eine Vielzahl isobarer und polyatomarer Interferenzen die Gehaltsbestimmung stört. Besonders die Oxide des Yttriums und Zirkoniums, sowie Hafniumoxid interferieren mit den einzelnen Palladium bzw. Platin Isotopenmassen. Nachfolgende Tabelle liefert einen Überblick über für die PGE-Analytik relevante Interferenzen und die Abundanz der Analytotope:

**Tabelle 12: Isobare und polyatomare Interferenzen auf Palladium und Platin in der ICP-MS mit Relevanz für die Umweltanalytik**

<b>Palladium</b>						
<i>Abundanz</i>	<i>1,02</i>	<i>11,14</i>	<i>22,33</i>	<i>27,33</i>	<i>26,64</i>	<i>11,72</i>
<b>Isotopenmasse</b>	<b>102</b>	<b>104</b>	<b>105</b>	<b>106</b>	<b>108</b>	<b>110</b>
Isobare Interferenzen				Cd	Cd	Cd
Polyatomare Interferenzen	SrO	SrO	YO	ZrO	ZrO	ZrO
<b>Platin</b>						
<i>Abundanz</i>	<i>0,014</i>	<i>0,782</i>	<i>32,97</i>	<i>33,83</i>	<i>25,24</i>	<i>7,163</i>
<b>Isotopenmasse</b>	<b>190</b>	<b>192</b>	<b>194</b>	<b>195</b>	<b>196</b>	<b>198</b>
Isobare Interferenzen					Hg	Hg
Polyatomare Interferenzen		HfO	HfO	HfO	HfO	

### 3.3.2 Methodenevaluierung der ICP-MS basierten PGE-Analytik ohne Matrixabtrennung

Zur Evaluierung der Methode werden Analytstandard-Lösungen mit einer definierten Menge an Störionen-Lösung versetzt.

Die Lösungen wurden aus ICP-Standards der Konzentration 1 g/L angesetzt. Dazu wird dieser 1:1000 mit 2%iger Salpetersäure verdünnt auf eine Endkonzentration von 1 ppm (1 mg/L). Aus diesen Stammlösungen werden Lösung 1 – Lösung 5 (siehe Tabelle 13) angesetzt. Zu jeder Lösung (inkl. Blank) werden 2 mL Salpetersäure (65%) zugegeben, um ein Ausfallen des Metalls bei der Verdünnung zu verhindern.

**Tabelle 13: Konzentrationen der Analytlösung (Pd, Pt), des internen Standards (Rh, Au) und der Störionen für Palladium und Platin (Sr, Y, Zr, Cd, Hf, Hg).**

	Pd, Pt	Rh, Au	Sr, Y, Zr, Cd	Hf, Hg
Blank	0	0	0	0
Lösung 1	1 ppb	10 ppb	0	0
Lösung 2	1 ppb	10 ppb	1 ppb	1 ppb
Lösung 3	1 ppb	10 ppb	10 ppb	10 ppb
Lösung 4	1 ppb	10 ppb	100 ppb	100 ppb
Lösung 5	0	0	100 ppb	100 ppb

Danach werden die Transienten der jeweiligen Massenspuren aufgenommen. Die Lösungen werden per direkter Ansaugung über eine Peristaltikpumpe aufgegeben. Der Wechsel der Lösungen nach aufsteigender Störionenkonzentration erfolgt in Intervallen von ca. 400 Sekunden.

Die Einstellungen des ICP-MS zur direkten Analyse von Palladium und Platin in Realproben ohne Matrixabtrennung entsprechen den Werten aus



Tabelle 9 (S. 67).

### 3.3.2.1 Analyse des zertifizierten Referenzmaterials BCR-723 und von PGE-Muscheln

Zur Überprüfen der Anwendbarkeit der Methode wurde das zertifizierte Referenzmaterial (CRM) BCR-723 analysiert. Dieses CRM ist der einzige verfügbare zertifizierte kommerziell erhältliche Pt und Pd Standard. Weiterhin wurden gegen Pd und Pt exponierte Muscheln auf die Gehalte von Palladium und Platin untersucht.

Dazu wurden die jeweiligen Proben wie in Abschnitt 3.1.3 und 3.1.4 beschrieben, aufgeschlossen und die Gehalte von Palladium und Platin mittels ICP-MS mit thermischer Membrandesolvatation bestimmt. Die Geräteparameter des ICP-MS entsprechen den in Tabelle 9

(siehe Seite 67) dargestellten Werten.

Die Kalibration erfolgte durch zwei 9-Punkt Kalibrationsreihen. Dazu wurden in vorher mit Salpetersäure ausgedampften 10 mL-Messkolben Lösungen mit Pd- und Pt-Konzentrationen von 0,005 bis 2000 µg/kg angesetzt. Um potentielle

Ungleichmäßigkeiten beim Auffüllen der

**Tabelle 14: Kalibrationsreihe gemessen vor den Proben (links) und nach den Proben (rechts)**

Konzentration niedrig [ppb]	Konzentration hoch [ppb]
0	1
0.005	2
0.01	5
0.02	10
0.05	20
0.1	50
0.2	100
0.5	200

Kolben auszugleichen, wurde Holmium als interner Standard zugegeben. Eine Lösung, die 10 ppb Rhodium und Gold enthält, wurde kontinuierlich zur Überwachung der möglichen Gerätedrift oder Plasmainstabilität über die Peristaltikpumpe zugegeben. Außerdem wurden zur Qualitätssicherung zwei Proben bekannter Konzentration mitgemessen. Es handelt sich um die Proben mit der Bezeichnung QS10 und QS5, die jeweils eine Palladium- und Platin-Konzentration von 10 bzw. 5 ppb haben. Sämtliche Messungen erfolgten als 5-fach Bestimmungen.

Dabei wurde folgende Messreihenfolge gewählt (beginnend oben links, spaltenweise):

**Tabelle 15: Messreihenfolge der Palladium- und Platin-Bestimmung**

0	Blank BCR	Tag70 PGE4	1
0.005	BCR	QS10	2
0.01	QS10	Blank	5
0.02	Blank	Tag 7 PGE 4	10
0.05	Tag 7 PGE 4	Tag14 PGE4	20
0.1	Tag14 PGE4	Tag28 PGE4	50
0.2	Tag28 PGE4	Tag42 PGE4	100
0.5	Tag42 PGE4	Tag70 PGE4	200
1	Tag56 PGE4	QS5	2000

### 3.4 Instrumentelles und Sonstiges

Alle in diesem Kapitel aufgelisteten Chemikalien, Gase, Labor- und Analysengeräte, sowie Verbrauchsmaterialien wurden, falls nicht anders beschrieben, verwendet wie angegeben. Die aufgeführten Parameter der Analysengeräte entsprechen den typischen Gerätekonfigurationen; Abweichungen und versuchsspezifische Einstellung sind bei den jeweiligen Versuchsbeschreibungen zu finden.

#### 3.4.1 Verwendete Großgeräte

Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten ICP-MS handelt es sich um das Modell 7500 ce mit Kollisionszelle der Firma Agilent Technologies (Waldbronn). Dieses Gerät ist standardmäßig mit einem Mikroflusszerstäuber nach Meinhard (AHF Analysentechnik AG, Tübingen) aus PFA ausgestattet, welcher ein Aerosol in einer Sprühkammer des Typs Scott (AHF Analysentechnik AG, Tübingen) erzeugt. Diese wird mittels Peltier-Element auf

2 °C temperiert. Zur Probenaufgabe bzw. zur Zugabe eines internen Standards ist eine integrierte Peristaltikpumpe vorhanden.

Als Massenspektrometer mit ESI-Quelle wird das Gerät Exactive der Firma Thermo Scientific (Bremen) verwendet. Dieses Benchtop-Massenspektrometer basiert auf der Orbitrap-Technologie und ist mit einer HESI-II-Quelle (Thermo Scientific, Bremen) zur Elektrospray-Ionisation ausgestattet. Die chromatographische Trennung erfolgt auf einer Accela UPLC (Thermo Scientific, Dreieich) bestehend aus einem Autosampler mit Säulenofen, einer quaternären Pumpe und einem Photodiodenarray- (PDA) Detektor. Accela und Exactive werden mit der Steuersoftware Xcalibur 2.0.7 (Thermo Scientific, Bremen) gesteuert.

Zur Analytik von Glutathion wurde die Accela UPLC mit einem ESI-qTOF-MS (Micromass/Waters, Manchester) gekoppelt. Die Gerätesteuerung erfolgte mit MassLynx (Waters, Manchester).

### 3.4.2 Verwendete Chemikalien und Gase

Übersicht der zur Erstellung der vorliegenden Doktorarbeit verwendeten Chemikalien:

**Tabelle 16: Verwendete Chemikalien**

<b>Chemikalie</b>	<b>Bezeichnung</b>
Acetonitril	VWR, LC-MS grade, Leuven
Ammoniaklösung	25 %, AppliChem, Darmstadt
Bismutcitrat	>98 %, Sigma-Aldrich, Steinheim
Glutathion (oxidiert)	>98 %, Sigma-Aldrich, Steinheim
Glutathion (reduziert)	>98 %, Sigma-Aldrich, Steinheim
HEPES	>98 %, Sigma-Aldrich, Steinheim
Interner Standard-Stammlösung für die IIC	1 ppm: Ga, Rb, Rh, Cs, Ce, Tl; 10 ppm: In
L-Cystein	>98 %, Fluka, Buchs, Schweiz
Methanol	VWR, LC-MS grade, Leuven
Multielement-Standardlösung	0,01 mg/l Lithium, Yttrium, Cer, Thallium und Kobalt in 2 % HNO <sub>3</sub> , Bernd Kraft GmbH, Duisburg

Palladium-ICP-Standardlösung	ICP-MS Standard, 1000 ppm, Bernd Kraft, Duisburg
Platin-ICP-Standardlösung	ICP-MS Standard, 1000 ppm, Bernd Kraft, Duisburg
Reinstwasser	Reinstwasser, Purelab Ultra und Sartorius arium <sup>®</sup> pro VF, spezifischer Widerstand: 18,2 MΩ·cm
Salpetersäure	65 %, Fisher Scientific, Leicestershire, Großbritannien (subboiled)
TRIS-Base	>99,8 %, BioRad, München
Zinkchlorid	>98 %, p.a., Fluka (Sigma-Aldrich), Steinheim

Zur Durchführung der Analysen wurden die in Tabelle 17 aufgelisteten Gase verwendet.

**Tabelle 17: Verwendete Gase**

<b>Gas</b>	<b>Bezeichnung</b>
Argon	Air Liquide, Bündelware, Argon 4.6, Düsseldorf
Helium	Air Liquide, Flaschenware, Helium 5.0, Düsseldorf
Stickstoff	Stickstoffgeneratoren NitroFlow Lab, Parker, Cleveland (Ohio, USA) sowie NGM-11-LC/MS, CMC, Eschborn mit ölfreiem Kompressor SF2FF inkl. 120 L Pufferbehälter von AtlasCopco, Essen.

### 3.4.3 Verwendete Laborausstattung und Verbrauchsmaterial

**Tabelle 18: Verwendete Laborausstattung und Verbrauchsmaterial**

Chromatographie-Säule	Hypercarb 50 mm x 1 mm, 3 μ (Thermo Scientific, Langenselbold)
Chromatographie-Säule	BioSEC 300 mm x 4,6 mm, 3 μ (Thermo Scientific, Langenselbold)
Einmal-Injektions-Kanülen	Sterican®, diverse Größen, Braun, Melsungen
Fittinge und Schlauchverbinder	Swagelok®, BEST Ventil + Fitting GmbH, Kaarst-Holzbüttgen
Glovebox	Anfertigung der Zentralen Werkstätten der Universität Duisburg-Essen. Siehe Abb. 69 Anhang
Greinerröhrchen	PP-Röhrchen 25/50 ml, Greiner
Homogenisator/Extraktor	Analytik Jena, SpeedMill, Jena
Kapillaren	Restek PEEK Tubing, 0,007" ID x 1/16"
Laborwaage	Sartorius Analysenwaage MP 61, Ablesbarkeit 0,0001 g, Göttingen
Laborwaage (ICP-Labor)	Adventurer, Genauigkeit 1 mg, Ohaus, Pine Brook, USA
Lysis-Tubes (Keramik-Kugeln)	Analytik Jena, innuSPEED Lysis Tube E, Jena

Mikrowelle	Mars5, CEM, Moers
pH-Meter	pH 211 Microprocessor pH Meter, Hanna instruments
pH-Teststreifen	Alkalit <sup>®</sup> , pH 7,5-14, Merck, Darmstadt
Reinstwasseranlage	Purelab ultra, spezifischer Widerstand: 18,2 MΩ·cm bei 25 °C, ELGA Labwater, Celle
Schraubdeckelgläser mit Septum	Mass Spec certified, Silikon-Septum, Thermo Scienitfic, Dreieich
Schraubflaschen	2 mL, Mass Spec certified, Thermo Scienitfic
Spritzen	10 ml, BD Discardit <sup>™</sup> II, Becton & Dickinson, Heidelberg
Transferpipetten	Finnpipetten <sup>®</sup> 20 – 200 µl, 200-1000µl, Thermo Scintific, Langenselbold

#### 3.4.4 Verwendete Software

Die Steuerung und Datenaufnahme des ICP-MS erfolgt mit der Software Chemstation. Accela und Exactive von Thermo Scientific werden mit der Software Xcalibur gesteuert. Aus der jeweiligen Software können die Daten ins CSV (comma separated values) Format übertragen werden. Die Korrelation der ESI-MS und ICP-MS Daten erfolgt nach Import der CSV-Dateien mit dem Programm Origin 8.1 der Firma OriginLabs. Ebenso wurde die Software Origin zur Darstellung der Kalibrationsgeraden mit Vertrauensintervall bei der Konzentrationsanalytik genutzt. Die Ermittlung der zugehörigen Kennzahlen, wie z.B. Nachweis- und Bestimmungsgrenze, sowie die Ermittlung des Messfehlers erfolgte in Microsoft Excel 2007 mit Hilfe des Makros „DinTest“.

### **3.5 Aufbau einer parallelen ESI-MS und ICP-MS Kopplung nach flüssigchromatographischer Trennung**

#### **3.5.1 Vorüberlegungen zur Realisierung einer LC/ESI-MS/ICP-MS Kopplung**

Zum Erreichen des Ziels der Arbeit - der Aufbau einer Kopplung zur parallelen Detektion von ESI-MS und ICP-MS nach flüssigchromatographischer Trennung - musste zu der vorhandenen ICP-MS mit Kollisionszellentechnologie ein Massenspektrometer mit ESI-Quelle beschafft werden. Die Wahl des Massenspektrometers musste angepasst an die analytische Fragestellung erfolgen. Dazu sind grundsätzlich zwei Fälle zu unterscheiden:

##### **1) Niedermolekulare Elementspezies**

Bei der Elementspeziation in biologischen Matrices werden im niedermolekularen Massenbereich Element-Aminosäure- bzw. Element-Peptid-Spezies erwartet. Eine exemplarische Verbindung dieser Klasse ist das (Methyl-)Quecksilberglutathion, welches als niedermolekulare Quecksilberspezies in Fisch identifiziert wurde [HARRIS et al. 2003]. Zwar kann mit einer Molekülmasse von <1000 Da bei diesen Metall-Peptid-Komplexen mit jedem kommerziellen Massenspektrometer eine Auflösung der Isotopenpeaks erreicht werden (vgl. Tabelle 5, Seite 44), durch die Kombination einer hohen Massenauflösung mit einer hohen Massengenauigkeit kann sogar die Summenformel einer Verbindung bis ca. 500 Da direkt aus dem Molekülpeak bestimmt werden [KIM et al. 2006]. Diese Eigenschaften können von Orbitrap und QTOF-Massenanalysatoren erfüllt werden (siehe Tabelle 19, Seite 80).

##### **2) Hochmolekulare Elementspezies**

Neben niedermolekularen Verbindungen können ebenso Metall-Protein-Spezies in biologischen Matrices auftreten. Bei einer gesteigerten Metallexposition werden insbesondere Metallothioneine hochreguliert [NISCHWITZ et al. 2003, FRANK et al. 2008], die mit einer Masse von ca. 8 kDa zu den hochmolekularen Metallspezies zählen.

Zur Realisierung einer parallelen online-Detektion von Metall-Protein-Spezies eignet sich die „top-down“-Charakterisierung des Proteins. Bei diesem Ansatz der Proteinmassenspektrometrie erfolgt die Identifikation eines Proteins über dessen intakte Masse [TIPTON et al. 2011]. Besonders die hochauflösende Fourier-Transform Massenspektrometrie ist für dieses Prinzip besonders geeignet [OUVRY-PATAT et al. 2009].

Das „bottom-up“-Prinzip, bei dem das (Metall-)Protein anhand der Aminosäuresequenz nach Verdau mit einer Protease identifiziert wird, eignet sich aufgrund der denaturierenden Probenvorbereitung nicht für die Speziesanalytik.

Anhand der möglichen Fragestellungen für die parallele ESI-MS und ICP-MS Detektion zur Elementspeziation können die folgenden Anforderungen an das Massenspektrometer definiert werden:

- Das MS sollte möglichst nachweisstark sein, um mit der Sensitivität des ICP-MS konkurrieren zu können
- Sowohl im niedermolekularen, als auch im hochmolekularen Massenbereich sollten Analysen möglich sein
- Die Ionenquelle sollte die typische Flussraten der Flüssigchromatographie unterstützen
- Die Massenbestimmung sollte möglichst exakt erfolgen, um die Speziesidentifikation zu erleichtern, bzw. die Bestimmung der Summenformel bei Molekülen geringer Masse zu ermöglichen
- Das Spektrometer sollte über eine hohe Auflösung verfügen, um eventuell auftretende Isotopenmuster auch in unübersichtlichen Spektren auflösen zu können, bzw. um die Ladungszustände von Proteinen direkt am Abstand der Isotopenpeaks zu erkennen.

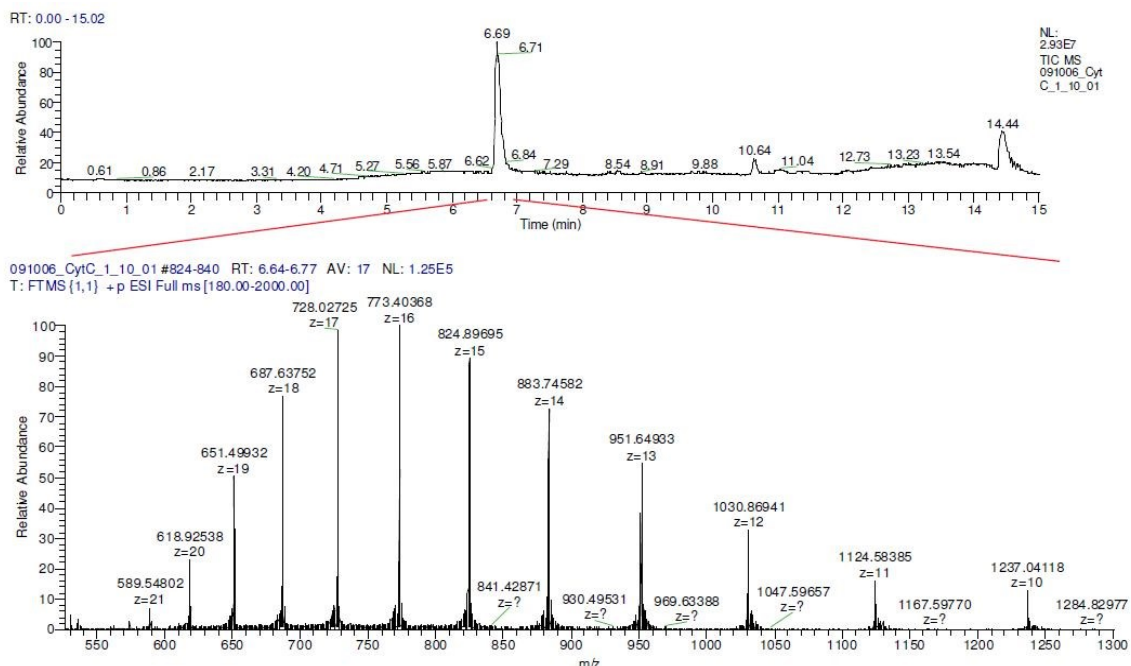
Das Massenspektrometer Exactive der Firma ThermoScientific war aufgrund der theoretischen Leistungsdaten das vielversprechendste Gerät, verglichen mit

Flugzeit-, Ionenfallen oder Triple-Quadrupol-Techniken. Die folgende Tabelle stellt die Übereinstimmung mit den geforderten Kriterien der jeweiligen Massenspektrometertypen dar.

**Tabelle 19: Eigenschaften der verschiedenen Massenspektrometertypen (zusammengestellt aus den Spezifikationen der Hersteller)**

Typus	Nachweistärke	Massenbereich	Massengenauigkeit	Massenauflösung	Legende
QQQ	++	+	-	--	++ (sehr gut)
IT	O	+	-	O	+ (gut)
TOF	+	++	+(+)	+	O (mäßig)
Orbitrap	++	+	++	++	- unzureichend

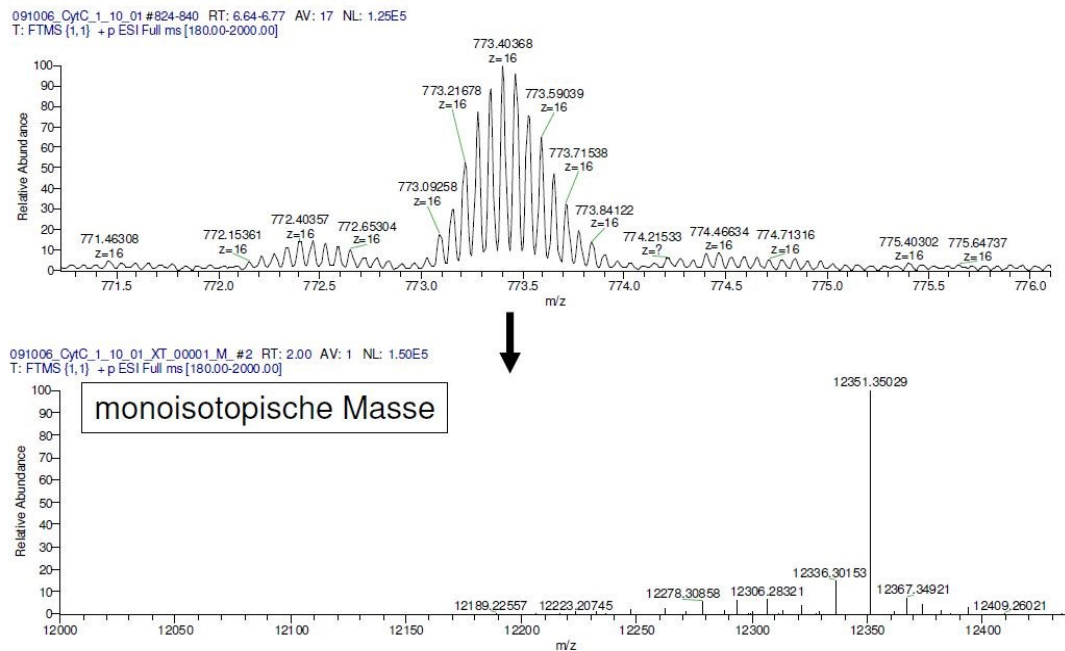
Die Eignung des Gerätes wurde vor dem Kauf durch Demo-Messungen im Applikationslabor von ThermoScientific überprüft. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Bestimmung von intakten Proteinen möglich ist. Nachfolgende Abbildung zeigt das Massenspektrum von Cytochrom C bei einer Retentionszeit von 7,21 min.



**Abb. 32: Chromatogramm in FullScan-Modus (oben), typisches „Envelope“-Massenspektrum eines Biopolymers bei  $t_R$  6,69 min (unten). Die Massenauflösung des Geräts betrug  $R = 50000$ .**

Die Vergrößerung des intensivsten Peaks im Cytochrom C-Summenspektrum bei  $m/z$  773,4 (Ladungszahl  $z = 16$ ) belegt, dass auch intakte Proteine aufgelöst und die monoisotopische Masse mit hoher Genauigkeit bestimmt werden kann.





**Abb. 33:** Das 16-fach geladene Cytochrom C - Ion zeigt, dass eine Auflösung von  $R = 50000$  zu annähernder Isotopenauflösung hinreichend ist. Die Dekonvolution der Ladungszustände generiert eine experimentelle monoisotopische Masse für Cytochrom C von 12351,35029 Da.

Die experimentellen Ergebnisse zeigen, dass die Anforderungen aus den Vorüberlegungen durch das Orbitrap-Massenspektrometer der Firma Thermo Scientific gut erfüllt werden.

### Technische Umsetzung der Kopplung

Zur Realisierung der Kopplung muss der Efflux der Säule aufgeteilt werden. Dazu sind unterschiedliche Arten der Realisierungen denkbar. Zum einen ist die Aufteilung des Flusses über ein totvolumenfreies T-Stück möglich, bei dem jedoch das Splitverhältnis nicht definierbar gewählt werden kann. Der Grund ist, dass das Splitverhältnis von festen Parametern, wie den Kapillardurchmessern und –längen abhängt, aber auch von der Viskosität und dadurch von variablen Größen wie Temperatur, Dichte der mobilen Phase und Druck.

Eine weitere Möglichkeit zum Teilen des Flusses besteht in einem Flussteiler. Dieses Bauteil wird in der präoperativen Chromatographie verwendet, um den geringeren Teil des Flusses einem Detektor zuzuführen und den Rest wahlweise zu verwerfen oder als Fraktion zu sammeln.

Der Flußteiler besteht aus einem variablen und einen fixierten Restriktor. Bei diesem Aufbau kann die Teilung des Flusses durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$Split = \frac{R_1}{R_2} = \frac{F_{out}}{f_{out}} \quad \text{Gleichung 10}$$

Die Zuordnung der Variablen kann der folgenden Abb. 34 entnommen werden, die den Aufbau und die Funktionsweise eines kommerziell-erhältlichen Flussteilers skizziert.

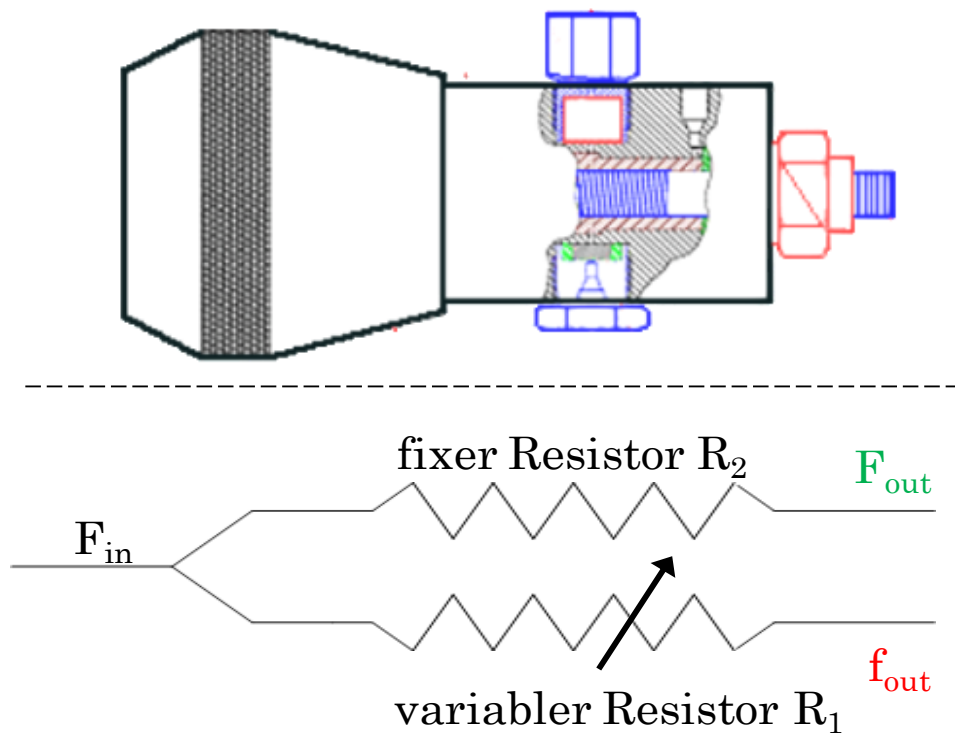


Abb. 34: Technische Realisierung des Flussteilers (oben), schematischer Aufbau (unten).

Durch die Verwendung eines variablen Restriktors beim Flussteiler kann ein variables Splitverhältnis gewählt werden, dass an die Analysenbedingungen angepasst werden kann. Der patentierte Aufbau des Flussteilers führt zu einem festen Splitverhältnis unabhängig von der Viskosität des zu teilenden Mediums: D.h. die Zusammensetzung der mobilen Phase in der LC beeinflusst das Splitverhältnis nicht. Deswegen wurde ein Flussteiler mit variablem Splitverhältnis der Firma ASI dem T-Stück vorgezogen, um in der Wahl des Splitverhältnisses offen zu sein und eine konstante Teilung des Flusses bei

variierender Laufmittelviskosität zu gewährleisten. Ein genereller Vorteil der Flussteilung ist außerdem, dass durch das Aufteilen des Volumenstroms die Ionisierung der Massenspektrometer im Bereich des optimalen Flusses von einigen 100 Mikrolitern pro Minute stattfinden kann.

Der schematische Aufbau der Kopplung ist in folgender Abb. 35 dargestellt.

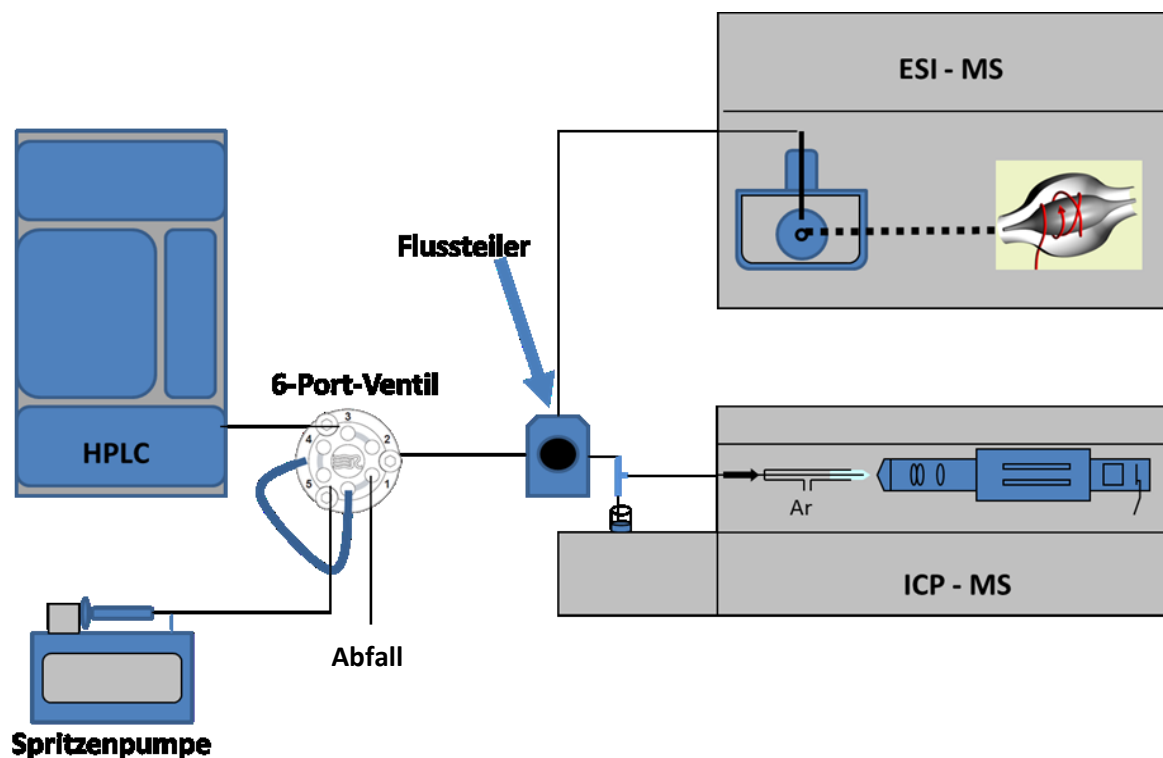


Abb. 35: Aufbau der LC/ESI-MS/ICP-MS online-Kopplung.

Die HPLC wurde mit einem 6-Port-Schaltventil verbunden. Dieses verfügt über eine Probenschleife, die zur Gerätekalibrierung mit Kalibrationslösung gefüllt werden kann. Ebenso kann eine Verbindung als Lock-Masse für die ESI-MS über die Spitzenpumpe, die ebenfalls durch das 6-Port-Ventil automatisiert in den Flussweg geschaltet werden kann, zu dosiert werden. Nach dem Schaltventil teilt der Flussteiler die mobile Phase auf: ein Teil wird in das ESI-MS geleitet, der Rest ins ICP-MS. Die Datenaufnahme auf beiden Massenspektrometern wird über ein 5 V-Signal des Autosamplers gestartet.

Um die generelle Funktionsweise der Kopplung zu belegen, wurden 1  $\mu\text{L}$  einer 10  $\mu\text{M}$  Selenomethionin-Standardlösung injiziert.

Diese ersten Messungen können die Funktionsweise der LC/ESI-MS/ICP-MS-Kopplung belegen und zeigen, dass die parallele molekül- und elementselektive Detektion zu auswertbaren Ergebnissen führt.

Die Kumulation der ESI-Massenspektren über die Peakbreite des Peaks der SeMet-Massenspür in nachfolgender Abbildung führt zu dem Massenspektrum in Abb. 37. Diese zeigt aus Gründen der Übersichtlichkeit einen Detailausschnitt

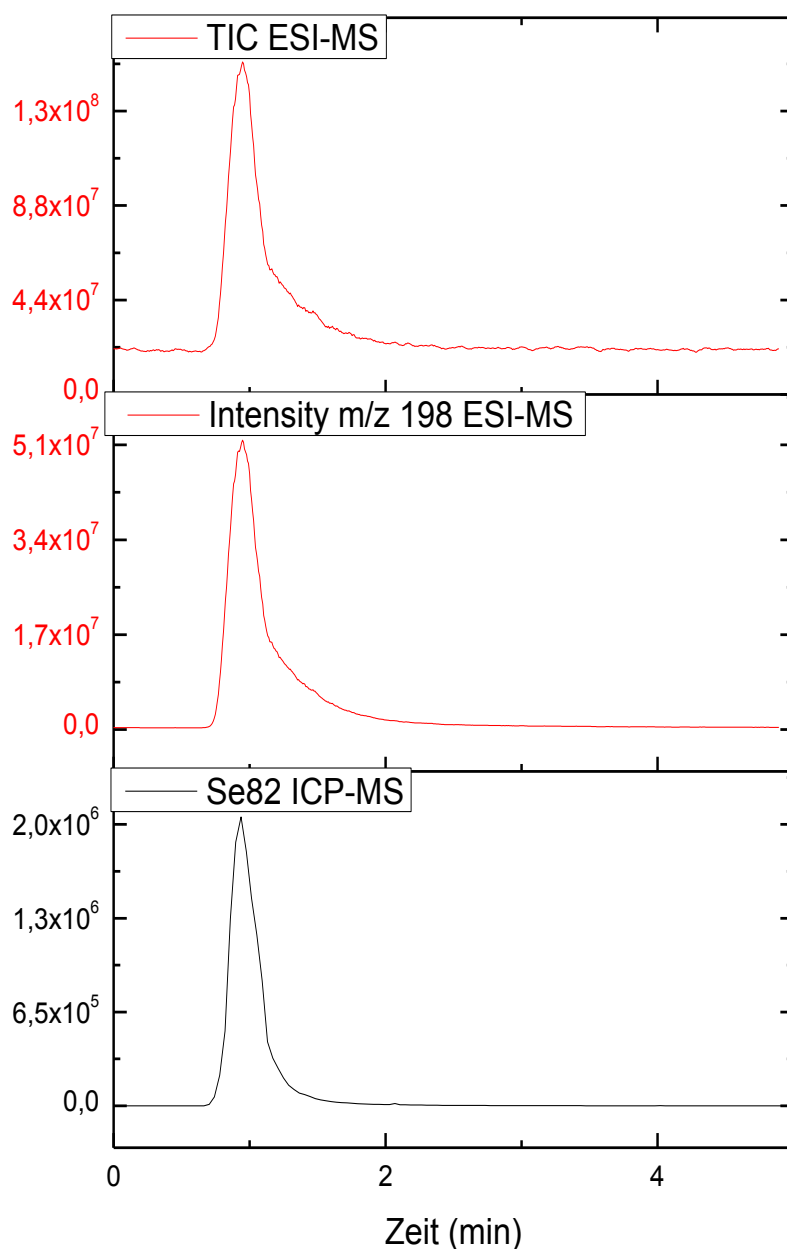


Abb. 36: ESI- TIC, extracted Ion Chromatogramm von  $m/z=198$  und die Selen ICP-MS Spur in Korrelation.

des Spektrums und das theoretisch berechnete Isotopenmuster des Selenomethionins.

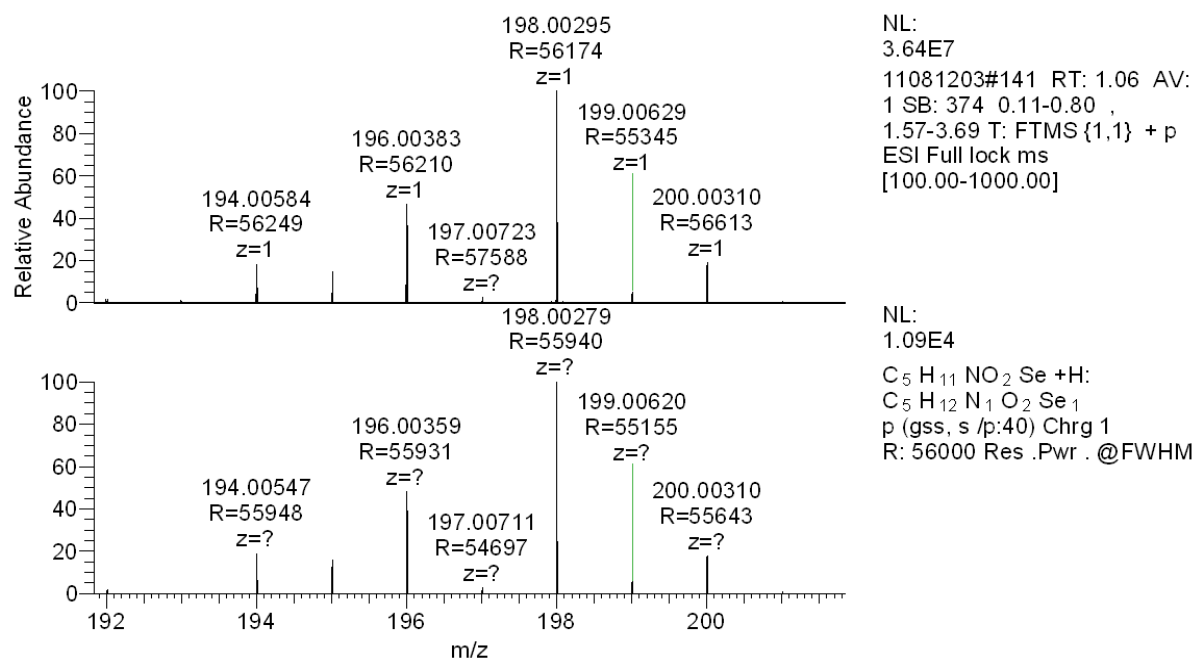
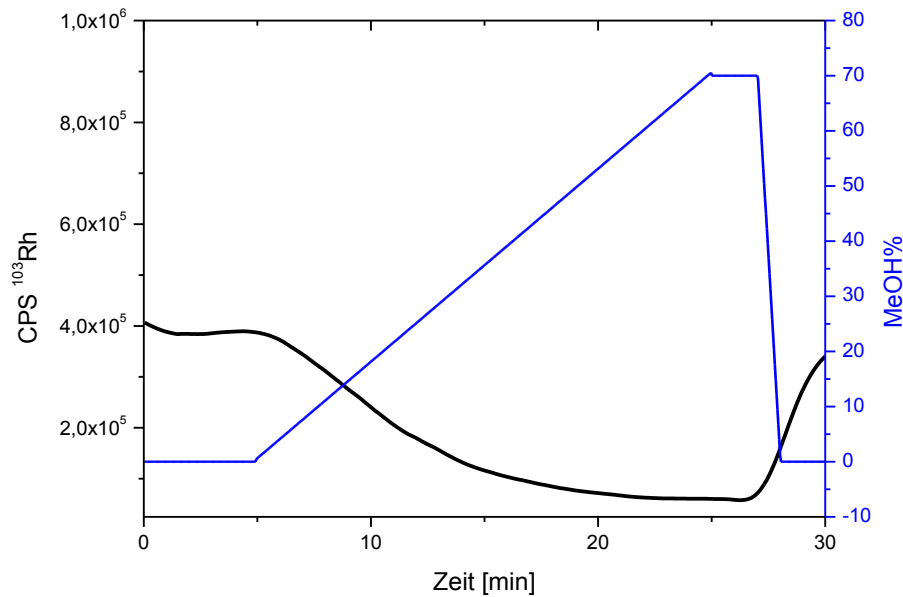


Abb. 37: Ermitteltes (oben) und berechnetes (unten) Massenspektrum von SeMet. Die Berechnung erfolgte für eine Auflösung von 56000 FWHM.

### 3.5.2 Gradientenelution bei paralleler ESI-MS und ICP-MS Detektion

Die Gradientenelution ist eine Standardanwendung in der Flüssigchromatographie. Hierbei beeinflusst man durch einen zeitlich bedingten Anstieg des organischen Anteils am Laufmittel die Polarität der mobilen Phase und somit auch das Verteilungsgleichgewicht zwischen mobiler und stationärer Phase. Die Elution von Verbindungen hoher Hydrophobizität wird begünstigt durch den steigenden Organikanteil. Die typischsten Gradienten in der Flüssigchromatographie sind Wasser-Methanol und Wasser-Acetonitril Verläufe. In der LC/ICP-MS basierten Speziesanalytik ist die Gradientenelution eine Herausforderung, da mit einer Änderung der Laufmittelzusammensetzung ebenso eine Änderung der Plasmabedingungen des ICP-MS einhergeht. Folgende Abbildung stellt die Ionisierungseffizienz in Abhängigkeit des Methanolanteils der mobilen Phase dar.



**Abb. 38: Ionisierungseffizienz einer 10 ppb Standardlösung Rhodium in Abhängigkeit eines Methanol-Gradienten. Mit steigendem organischem Laufmittelanteil verringert sich die Signalstärke des Rhodiums. (Abbildung nach Anwendung des Savatzky-Golay Algorithmus).**

Eine Vermeidung des Signaleinbruchs lässt sich auf verschiedene Weisen erreichen:

1. Vermeidung eines organischen Anteils am Laufmittel
2. „Reverse Gradient“-Technik
3. Abtrennung des organischen Laufmittelanteils vor Ionisierung im ICP-MS

Zu Punkt 1)

Eine Vermeidung von organischen Laufmittelgradienten steht im Gegensatz zu dem Ziel eine generische Kopplungsmethodik zu entwickeln. Zwar sind bei stationären Phasen wie der SEC organische Laufmittelanteile selten, aber grundsätzlich sollte auch ein Betrieb der Kopplung unter Umkehrphasen-Bedingungen möglich sein. Weiterhin wirkt sich ein organischer Anteil positiv auf die Ionisierungseffizienz einer Verbindung in der ESI-MS aus, so dass dieser durchaus erwünscht ist.

Zu Punkt 2)

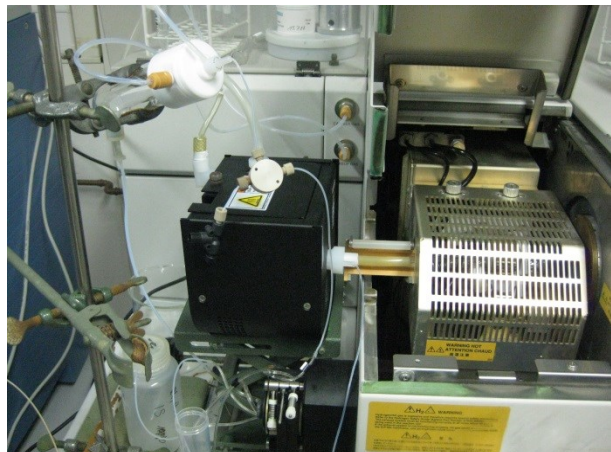
Die „Reverse Gradient“-Technik beruht auf dem Prinzip, dass bei der Gradientenelution durch die Verwendung einer weiteren LC-Lumpe ein quasi-stationärer organischer Laufmittelanteil erzeugt wird (vgl. S. 60). Nachteile

dieser Methode sind die Verdünnung der Probe durch den zusätzlichen Fluss und die Notwendigkeit das ICP-MS außerhalb der optimalen Geräteperformance zu betreiben. Außerdem ist die Verwendung einer weiteren Pumpe mit hohen Investitionskosten verbunden.

Zu Punkt 3)

Unter Verwendung eines Membrandesolvators, wie er bei älteren ICP-MS Modellen ohne kühlbare Sprühkammer eingesetzt wird, können auch organische Laufmittel abgetrennt werden. Da dieses Gerät nur Einfluss auf die ICP-MS hat, ändert sich die Ionisierungseffizienz des ESI-MS nicht. Der positive Nebeneffekt der Membrandesolvatation ist eine deutlich reduzierte Oxidbildungsrate in dem ICP-MS, was zu einer höheren Toleranz gegenüber dieser Art der Interferenz führt. Als Nachteile ist die Inkompatibilität des kommerziell erhältlichen Membrandesolvators mit dem vorhandenen ICP-MS 7500ce der Firma Agilent anzuführen, sowie eine Beschränkung auf Flussraten, die 100  $\mu\text{L}/\text{min}$  nicht überschreiten.

Die Umsetzung erfolgt, indem das Peltier-Element der Sprühkammer von dem ICP-MS entfernt und die Sprühkammer inklusive Zerstäuber an einem Stativ befestigt wurde. Diese Sprühkammer wurde dann durch PE-Schläuche mit dem Membrandesolvator der Firma ESI verbunden. Der Aerosolstrom wird nach Passage der Desolvationsschnecke direkt in die Plasmafackel des ICP-MS geleitet.



**Abb. 39: Aufbau von Sprühkammer und Membrandesolvator zur Erhöhung der Matrixtoleranz des ICP-MS.**

Schematisch entspricht der Aufbau der folgenden Abbildung:

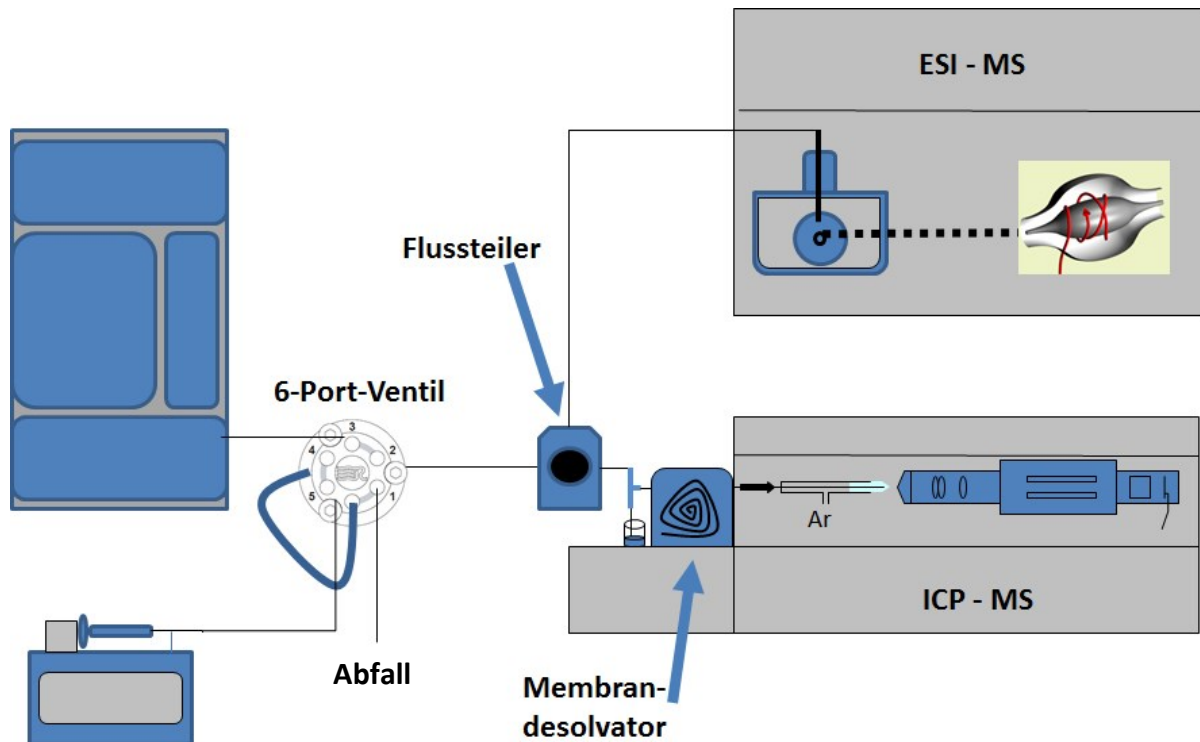


Abb. 40: Aufbau der LC/ESI-MS/ICP-MS online-Kopplung inklusive Membrandesolvator zur Erhöhung der Matrixtoleranz organischer Laufmittelzusammensetzungen.

Im Vergleich zu Abb. 38 auf Seite 86 wird nun unter identischen Versuchsbedingungen ein deutlich stabileres ICP-MS Signal erreicht, so dass auch bei steigendem Organik-Anteil am Laufmittel eine gleichbleibend hohe Signalintensität gewährleistet ist.

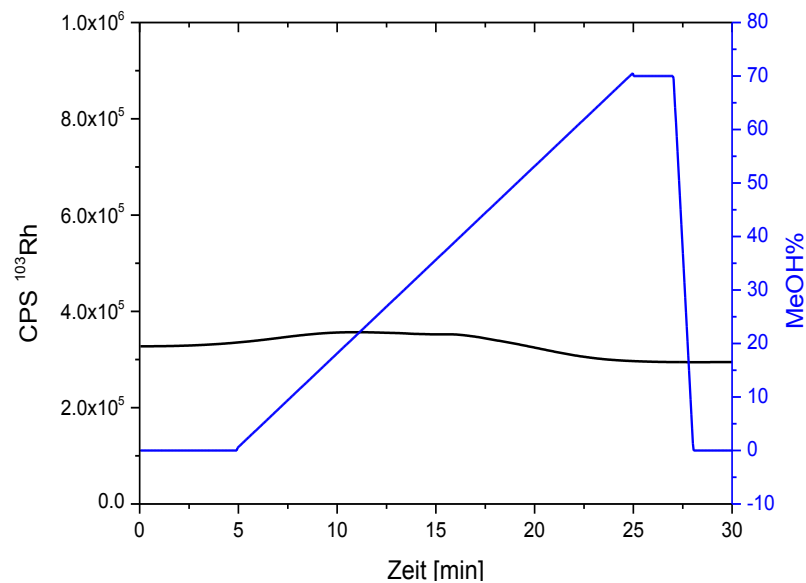


Abb. 41: Ionisierungseffizienz einer 10 ppb Standardlösung Rhodium in Abhängigkeit eines Methanol-Gradienten. Die Signalstärke des Rhodiums kann als konstant betrachtet werden. (Abbildung nach Anwendung des Savatzky-Golay Algorithmus).



## **4. Ergebnisse und Diskussion**

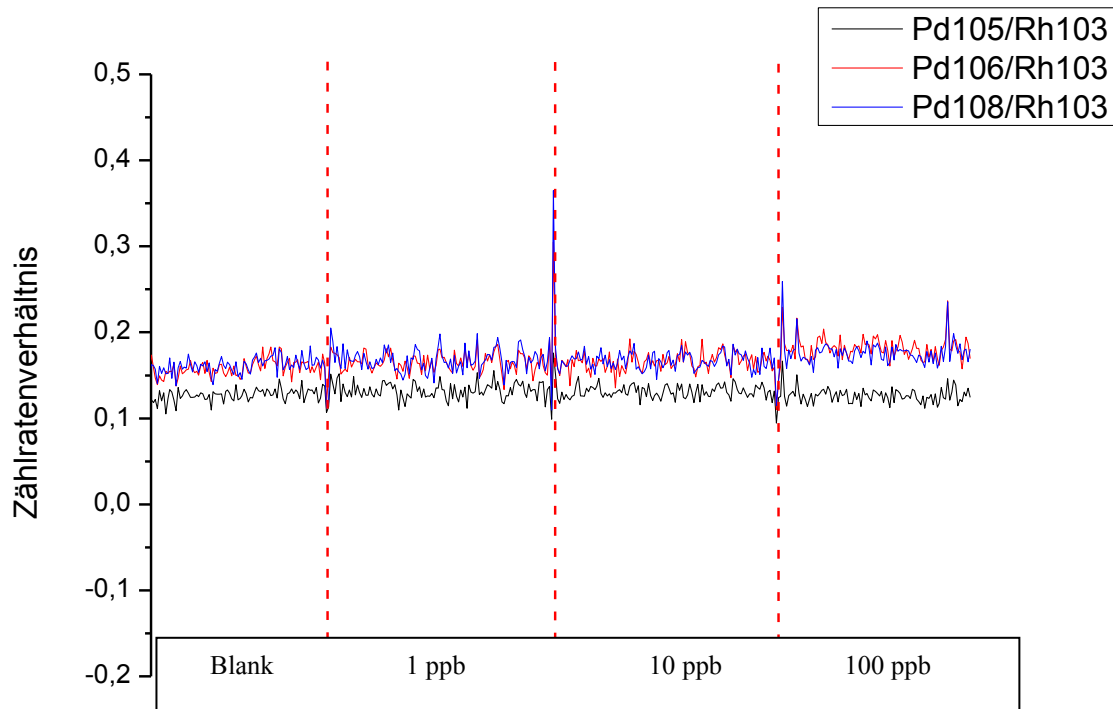
Das nachfolgende Kapitel 4 beinhaltet die Ergebnisse der Experimente, sowie deren Einordnung in den wissenschaftlichen Kontext. Dabei wird zuerst die Interferenzfreiheit der PGE-Analytik mit der ICP-MS belegt. Darauf folgt die Identifikation von Palladium und Platin Proteinspezies mit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten LC/ESI-MS/ICP-MS.

Ebenso werden in diesem Kapitel Untersuchungen zur Rolle des Zinks im Kontext des oxidativen Stresses und zur Strukturaufklärung des Zink-Glutathions präsentiert. Diesen thematischen Block schließt die Quantifizierung von GSH und GSSG in Realmatrices ab.

### **4.1 Evaluierung der PGE-Analytik ohne Matrixabtrennung**

Ausgewertet wird - als Ausgleich möglicher Pipettierunregelmäßigkeiten und Gerätedrifterscheinungen – das Verhältnis der Intensitäten der jeweiligen Palladium-Massenspuren zum Rhodium-Standard, bzw. Platin in Relation zum Gold-Signal. Für eine detaillierte Versuchsbeschreibung, die eine genaue Auflistung der Störionen und deren Konzentrationen enthält sei auf Kapitel 3.3.2 verweisen.

Folgendes Zählratenverhältnis konnte für Palladium/Rhodium ermittelt werden:



**Abb. 42: Zählratenverhältnis von Palladium und Rhodium bei verschiedenen Störionenkonzentrationen.**

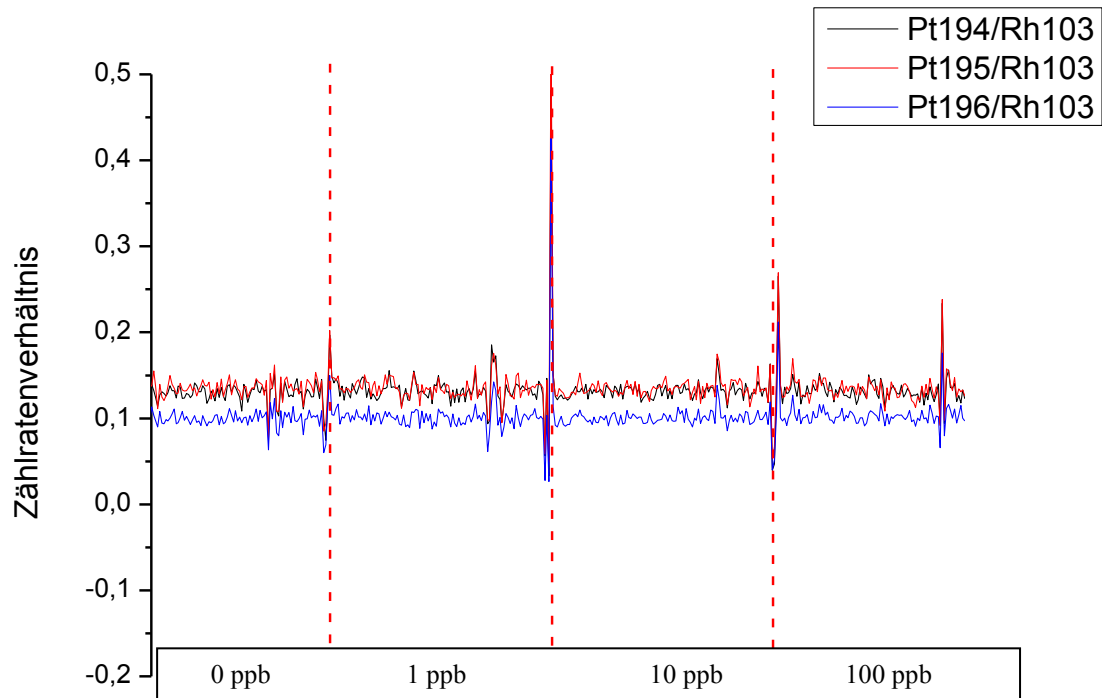
Die Darstellung in Abb. 42 zeigt eine gute Signalstabilität trotz steigender Störionenkonzentration. Es werden die drei Isotope mit der höchsten relativen Intensität betrachtet, weil eine Quantifizierung anhand dieser Isotope gegenüber solchen mit geringem Vorkommen vorzuziehen sind.

Das Ausblenden von isobaren Interferenzen ist mit einem Quadrupol-Massenspektrometer wegen der Einheitsmassenauflösung nicht möglich, jedoch können die polyatomaren Interferenzen reduziert werden, so dass die quantitative Analytik von Palladium ohne vorherige Matrixabtrennung ermöglicht wird. Der geringfügige Anstieg der Pd106/Rh103 und Pd108/Rh103 Signale (Abb. 42, rote und blaue Linie) kann durch die isobare Interferenz von  $^{106}\text{Cd}$  und  $^{108}\text{Cd}$  erklärt werden. Das nicht-stabile Cadmiumisotop 106 wird aufgrund seiner durch eine Halbwertszeit von  $10^{18}$  Jahren bedingten Beständigkeit und seiner relativen Häufigkeit von 1,25 % [AUDI et al. 2003] von dem ICP-MS detektiert. Auch interferiert das Isotop  $^{108}\text{Cd}$  mit einer relativen Häufigkeit von 0,89 % mit  $^{108}\text{Pd}$ . Keine erkennbaren Störungen in dem ICP-MS

nach Membrandesolvatation und gleichzeitiger Verwendung einer Helium-Kollisionszelle weist das Palladiumisotop 106 auf. Aufgrund der rel. Häufigkeit von ca. 21 % und des in dem ICP-MS unbeeinflussten Signals dieses Isotops, ist es am besten für die direkte Quantifizierung von Palladium ohne vorherige Matrixabtrennung geeignet.

Im Gegensatz zu polyatomaren Interferenzen besteht bei isobaren Interferenzen die Möglichkeit einer mathematischen Korrektur, indem man die übrigen Isotope des Cadmiums ebenfalls aufzeichnet und die dem Isotopenverhältnis entsprechende Anzahl an Ereignissen („Counts“) von der Gesamtzahl der registrierten Ionen auf den Massen  $m/z = 106$  bzw.  $m/z = 108$  subtrahiert.

Platin wird ebenfalls in Relation zu Rhodium als internen Standard gesetzt. Wiederum werden die drei Platinisotope mit der größten relativen Häufigkeit betrachtet. Keines der Zählratenverhältnisse weist bei einer Erhöhung der Störionenkonzentration eine Veränderung auf (Abb. 43, S.92). Folglich eignen sich die Platinisotope 194, 195 und 196 zur Quantifizierung von Platin mit dem ICP-MS ohne vorherige Matrixabtrennung. Die erkennbaren Signalausschläge in Abb. 43 resultieren auf Luftblasen, die bei dem Wechsel der Lösungen ins System eingebracht wurden. Da dieser Effekt zeitlich begrenzt ist, hat er keinen Einfluss auf die Qualität der Daten.



**Abb. 43: Zählratenverhältnis von Platin und Rhodium bei verschiedenen Störionenkonzentrationen.**

Die entwickelte Methode zur quantitativen Analyse von Palladium und Platin mittels ICP-MS zeigt eine hohe Signalstabilität trotz des 100-fachen Überschusses an Störionen.

Die Funktionsweise der Methode beruht dabei auf der Kombination von Membrandesolvatisierung mit einer Helium-Kollisionszelle. Dadurch können die für die ICP-MS typischen Oxidbildungsraten von ca. 2 % so weit reduziert werden, dass diese nicht mehr detektierbar sind ( $<0,2\%$ ). Die Anwendung der Kollisionszellen-Technologie alleine führt zu einer Oxidbildung von ca. 0,8 % - 1,1 %. Eine vergleichbare Reduzierung erhält man durch die Membrandesolvatisierung. Die Verwendung nur einer der beiden Techniken zur Interferenzminimierung führt unter Benutzung der Lösungen aus Tabelle 13 (Seite 72) zu folgendem Ergebnis:

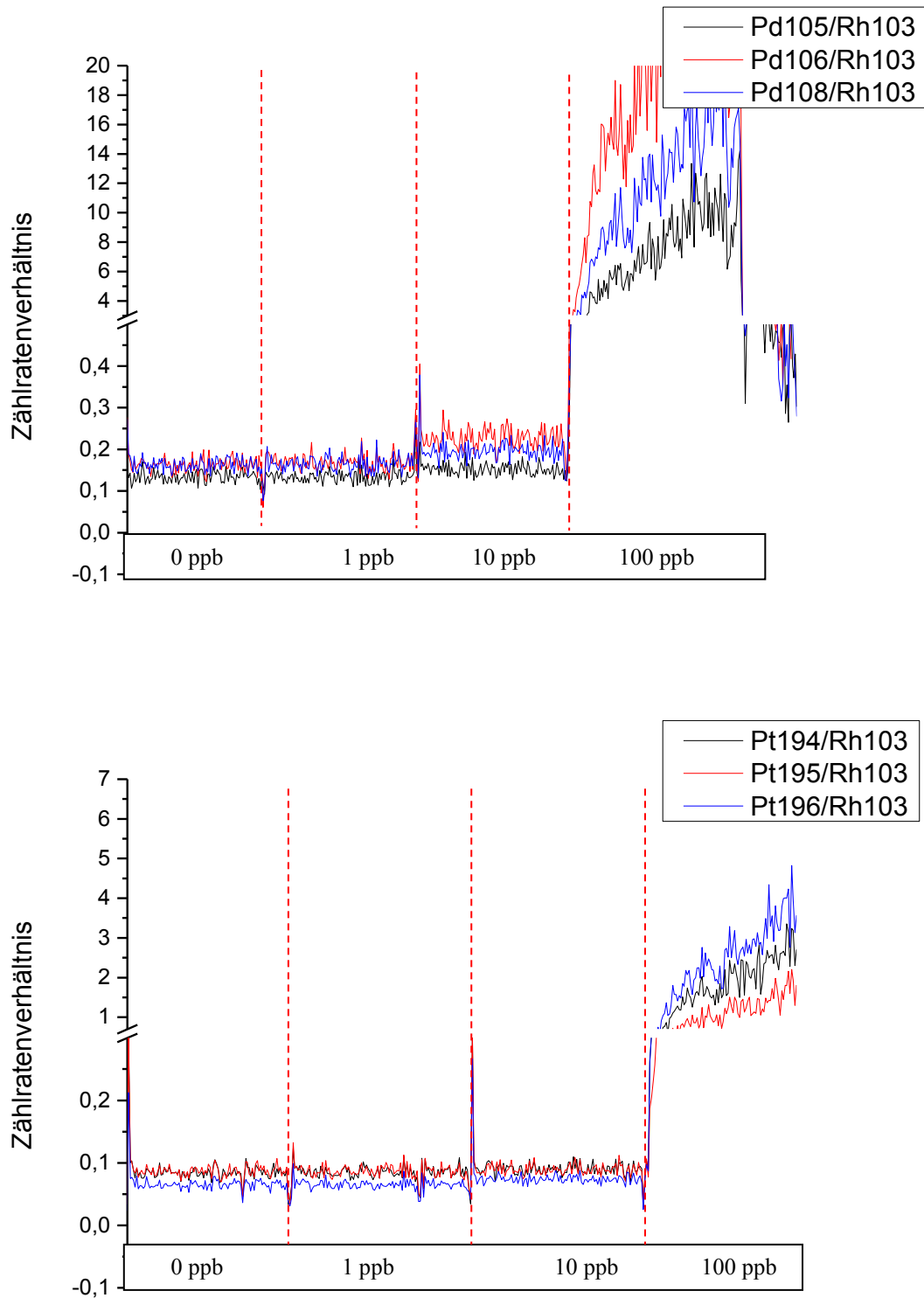


Abb. 44: Einfluss der Störionen bei Membrandesolvatisierung ohne Verwendung der Kollisionszelle für Palladium (*oben*) und Platin (*unten*).

Die Abbildung ist exemplarisch und zeigt den Anstieg der Interferenzen besonders deutlich ab einer Konzentration der störenden Elemente von 100 ppb.

Erst die Kombination beider Techniken führt zu einer verlässlichen quantitativen Detektion von Pd und Pt.

Dieses kann durch die Quantifizierung von PGE in zertifiziertem Referenzmaterial belegt werden.

#### 4.2 Analyse des zertifizierten Referenzmaterials BCR-723 und von PGE-Muscheln

Die Erstellung der Kalibrationsgeraden erfolgte mit der Excel-Erweiterung DINTest. Die vollständigen Berichte mit den analytischen Kenngrößen inklusive Geradengleichungen der Kalibrierfunktionen können dem Anhang entnommen werden. Für ein besseres Verständnis seien die wichtigsten dieser Größen hier kurz diskutiert.

Es ergeben sich entsprechend der DIN 32645 folgende Werte für Bestimmungsgrenze (BG) und Nachweisgrenze (NWG):

**Tabelle 20: Nachweis- und Bestimmungsgrenze von Pd und Pt bei der Gesamtmetallbestimmung**

	<b>Pd [ppb]</b>	<b>Pt [ppb]</b>
<b>NWG</b>	0.018	0.026
<b>BG</b>	0.061	0.09

Die Regressionsgeraden weisen Linearitätsfaktoren R von 0,9994 bis 1,0000 auf.

Aus den Geradengleichungen ergeben sich die im Folgenden zusammengefassten Konzentrationen:

Tabelle 21: Ergebnisse der Gesamtmetallanalyse von Pd und Pt (ausführliche Daten siehe Anhang)

Probe	Konzentration Pd [ppb]	StaAbw Pd [ppb]	Konzentration Pt [ppb]	StaAbw Pt [ppb]
Blank BCR	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG
BCR	7.1	2.1	81.4	0.4
QS10	10.2		9.7	
Blank	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG
Tag 7 PGE 4	Keine Daten	Keine Daten	< NWG	< NWG
Tag14 PGE4	6.8		< NWG	< NWG
Tag28 PGE4	13.7		< NWG	< NWG
Tag42 PGE4	15	2.2	< NWG	< NWG
Tag70 PGE4	17.7		< NWG	< NWG
QS10	5.8		9.0	
Blank	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG
Tag 7 PGE 1	< NWG	< NWG	7.1	0.6
Tag14 PGE1	< NWG	< NWG	9.8	0.1
Tag28 PGE1	< NWG	< NWG	23.0	0.3
Tag42 PGE1	< NWG	< NWG	39.0	0.0
Tag70 PGE1	< NWG	< NWG	58.4	0.0
QS5	4.9		5.2	

Die Messung mittels ICP-MS mit Membrandesolvatation des zertifizierten Referenzmaterial BCR-723 führt zu folgenden Resultaten:

Tabelle 22: Vergleich der gemessenen Werte des zertifizierten Referenzmaterials BCR-723 mit den zertifizierten Angaben

Probe	Konzentration Pd [ppb]	StaAbw Pd [ppb]	Konzentration Pt [ppb]	StaAbw Pt [ppb]
BCR (gemessen)	7.1	2.1	81.4	0.1
BCR (zertifiziert)	6.1	1.9	81.8	2.5

Die Ergebnisse aus Tabelle 22 belegen die Anwendbarkeit der Methode zur quantitativen Analyse von Palladium und Platin auch in Anwesenheit eines Überschusses an Störionen wie z. B. Hafnium oder Yttrium.

Zwar ist die Aussagekraft des zertifizierten Referenzmaterials für den gesamten analytischen Prozess der PGE-Analytik in Muscheln begrenzt, aber es kann gezeigt werden, dass die Methode valide Werte für vollständig aufgeschlossene PGE-Proben erzeugt. Mögliche Interferenzen hätten zu einer deutlichen Verschiebung in Richtung höherer Konzentrationen geführt.

Daher ist eine Anwendung auch zur Bestimmung der Palladium- und Plattingehalte nach Aufschluss möglich. Die exemplarischen Messungen aus Tabelle 22 weisen auf folgende Trends bezüglich der zeitabhängigen Aufnahme von Palladium und Platin durch die Dreikantmuschel hin:

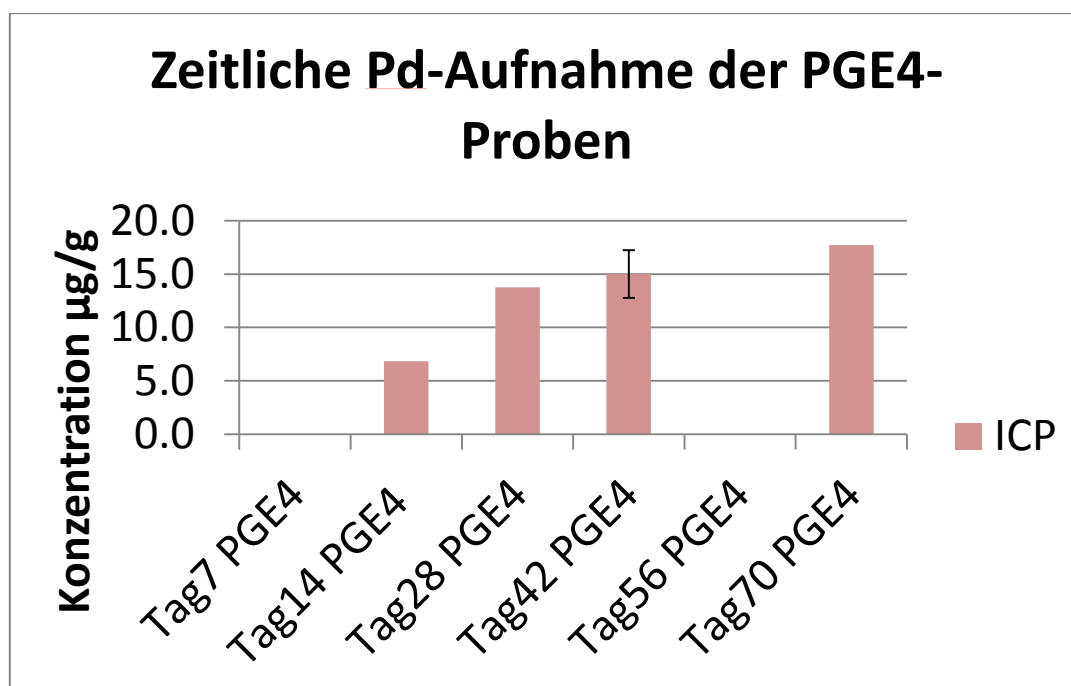


Abb. 45: Exemplarische Daten für die zeitabhängige Aufnahme von Pd durch die Dreikantmuschel.

Bei den Proben mit der Bezeichnung QS5 bzw. QS10 handelt es sich um eine Standardlösung mit einer Palladium- und Platinkonzentration von 5 bzw. 10 ppb, die zur Qualitätssicherung in regelmäßigen Abständen in die Analysesequenz eingefügt worden sind.



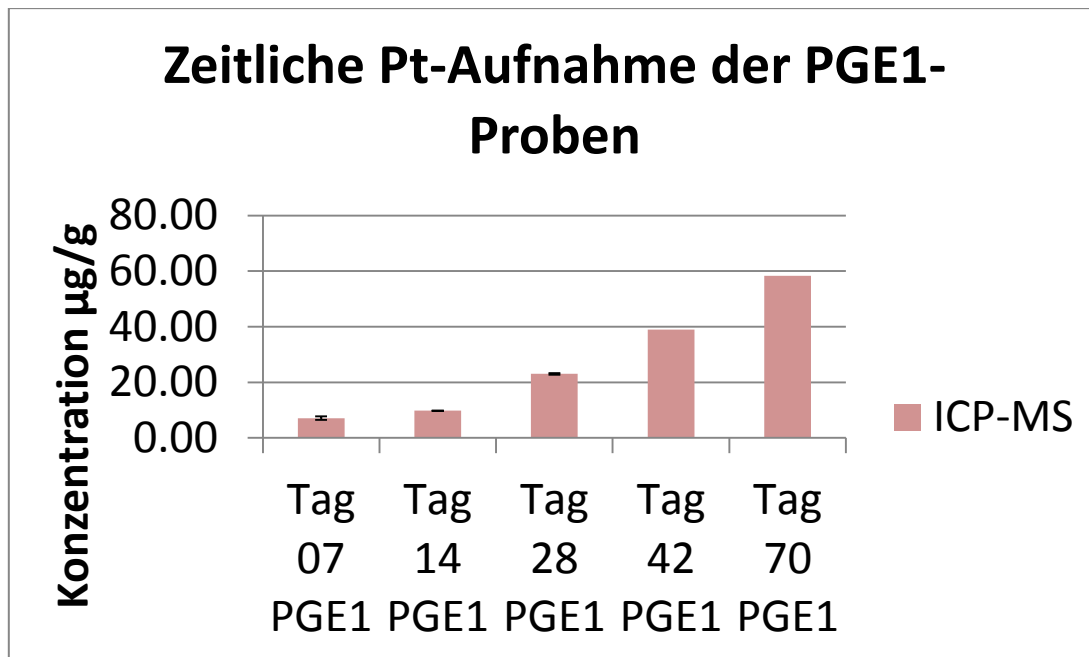


Abb. 46: Exemplarische Daten für die zeitabhängige Aufnahme von Pd durch die Dreikantmuschel.

In Abb. 45 und Abb. 46 ist deutlich zu erkennen, dass ungefähr die dreifache Menge Platin verglichen mit Palladium aufgenommen wird.

Dieser Trend sollte in einer nachfolgenden Arbeit durch eine größere Anzahl an Proben bestätigt werden.

Darüber hinaus zeigt sich, dass die Ergebnisse in gutem Einklang mit den von David Riesop mittels Laserabtragung und anschließender ICP-MS Messung ermittelten Werte sind. Die Abbildungen auf nachfolgender Seite belegen eine ca. um den Faktor 3 höhere Konzentration von Platin im Vergleich zu Palladium.

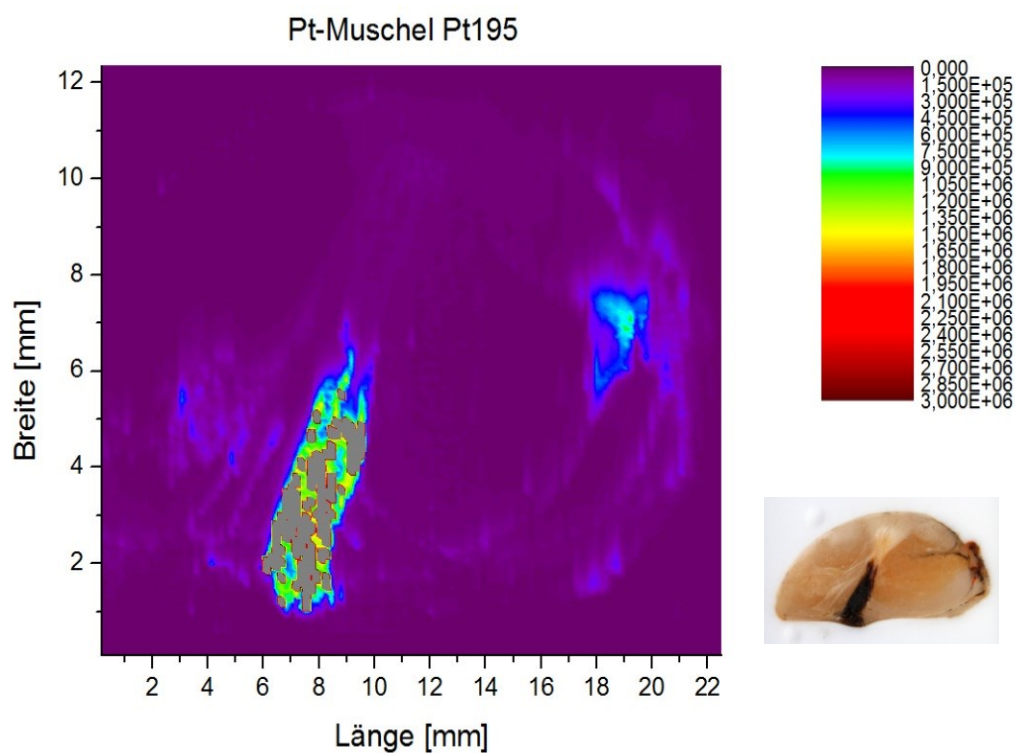


Abb. 47: Die Pt-Verteilung in einer Dreikantmuschel liegt bei Intensitäten von  $3E6$ -Counts (Abbildung zur Verfügung gestellt von David Riesop).

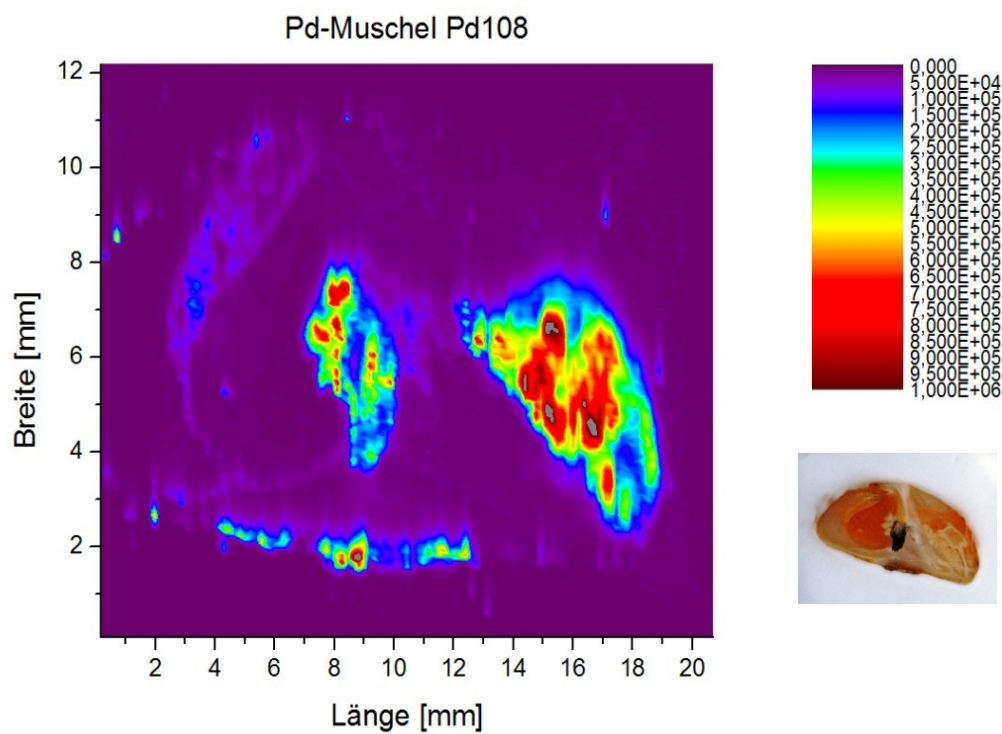


Abb. 48: Die Pd-Verteilung in einer Dreikantmuschel liegt bei Intensitäten von  $1E6$ -Counts (Abbildung zur Verfügung gestellt von David Riesop).

### **4.3 Speziesanalytik von Palladium und Platin mittels LC/ESI-MS/ICP-MS in Muschelweichgewebe**

Die Speziesbestimmung im Muschelweichgewebe erfolgt mit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten LC/ESI-MS/ICP-MS online Kopplung. Die im Umfeld dieser Dissertation angefertigte und von mir betreute Arbeit von Klaudia Gwosdz zeigt, dass die Größenausschlusschromatographie die schonendste Trennmethode für diese analytische Fragestellung darstellt [Gwosdz 2012].

Daher wurde diese stationäre Phase zur Metallspeziesanalytik in Gewebeextrakten der Dreikantmuschel verwendet.

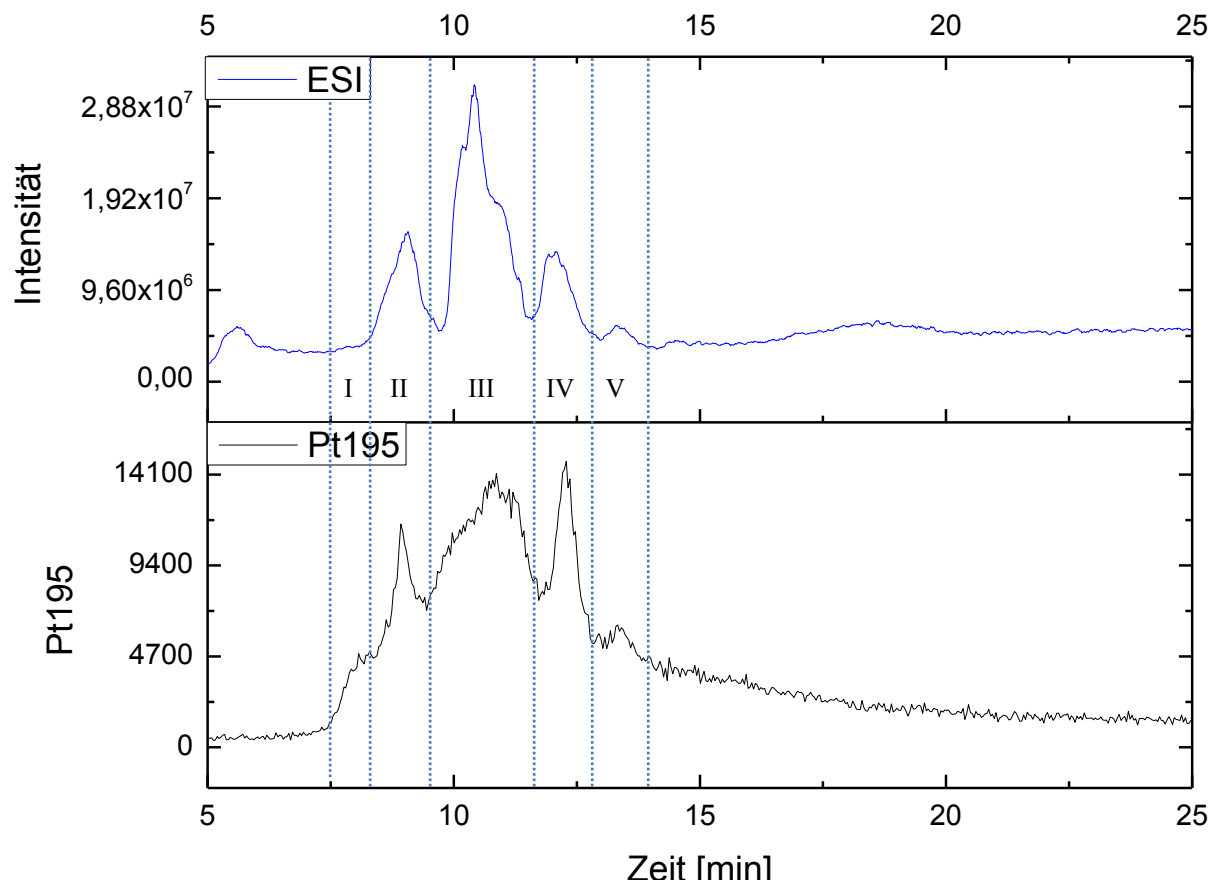
Zur besseren Ionisierung in der Elektrosprayquelle wird isokratisch 10 % Methanol verwendet (vgl. chromatographischen Bedingungen)

In einer weiteren Arbeit im Umfeld der vorliegenden Dissertationsschrift konnte Kamil Michalski unter meiner Anleitung zeigen, dass hinsichtlich der Nativität von Metallproteinen am Beispiel der Meerrettichperoxidase bei einem Anteil von 10 % Methanol an der mobilen Phase die Metallbindung des Häm-Eisens und damit die enzymatische Aktivität erhalten bleibt [Michalski 2012].

Die Extraktion der Spezies aus dem Weichgewebe erfolgte wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben: Sämtliche Schritte wurden unter Ausschluss von Luftsauerstoff und bei physiologischem pH-Wert durchgeführt. Die Messung erfolgte im direkten Anschluss, um das Risiko einer Degradation der Elementspezies zu verringern.

Exemplarische Rohdatenspektren sind aus Gründen der Lesbarkeit der Arbeit im Anhang gezeigt. Die graphische Darstellung ist durch die Komplexität der Apparatur sehr aufwendig, weswegen nur einige exemplarische Spektren gezeigt werden und stattdessen hiermit auf die Xcalibur-Dateien hingewiesen wird.

Ein exemplarisches Chromatogramm für ein Gewebeextrakt von Platin exponierten Muscheln ist in folgender Abbildung dargestellt.



**Abb. 49: Korrelation des ESI TICs (oben) mit der Platin-Spur des ICP-MS (unten) eines Dreikantmuschel Gewebeextrakts gegen Platin exponierter Individuen.**

Das ICP-MS Chromatogramm weist fünf Fraktionen auf, die Platin enthalten. Eine Korrelation des Metallsignals mit dem ESI-MS Chromatogramm und die anschließende Summation der ESI-Spektren über den jeweiligen Elutionszeitraum der einzelnen Platinfraktionen deuten auf verschiedene Proteine als prominente Platinspezies hin. Die dadurch erhaltenen Daten über die intakte Masse der Platinspezies kann nun zu einer wahrscheinlichen Zuordnung der Bindungspartner des Platins verwendet werden. Dabei findet ein manueller Abgleich mit dem in der UniProt Datenbank gelisteten Proteom der *Dreissena Polymorpha* statt.

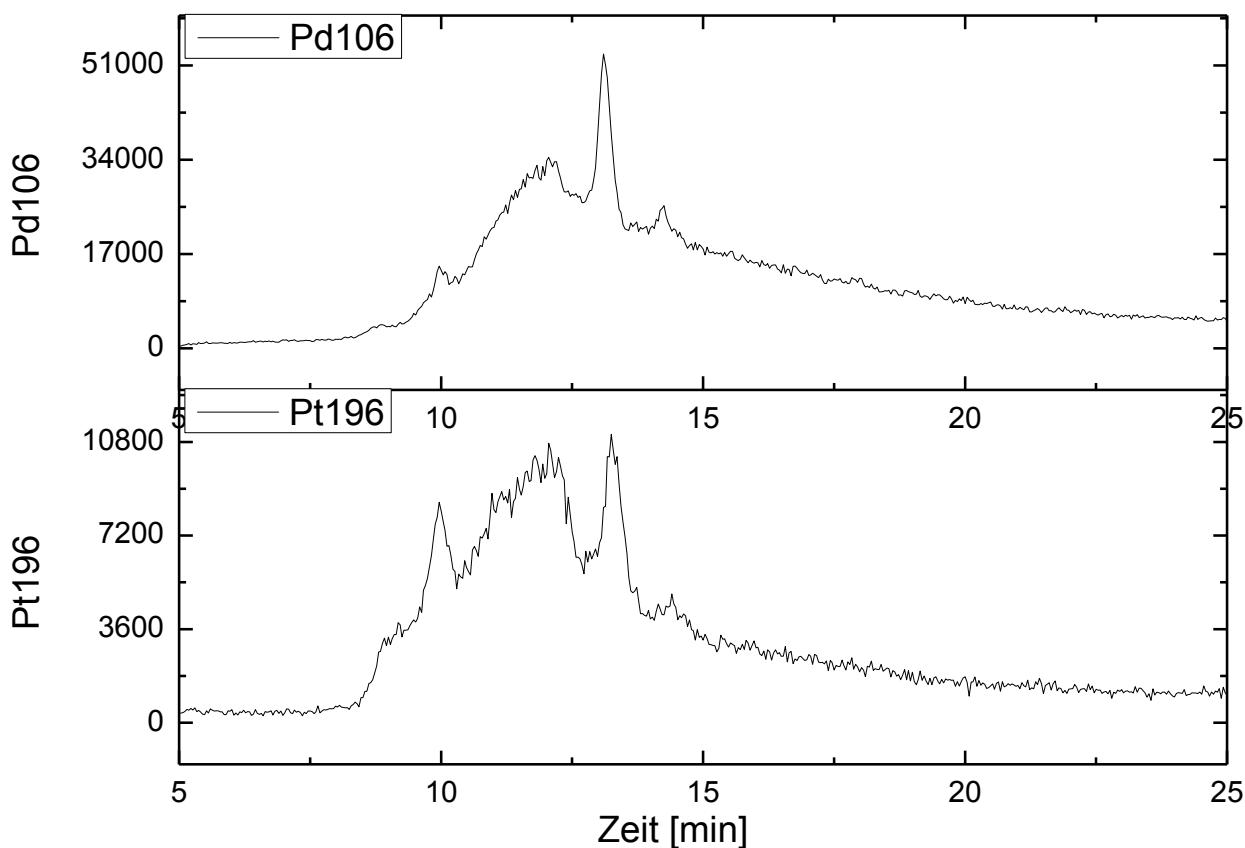
Eine mögliche Zuordnung ist in

Tabelle 23 dargestellt.

**Tabelle 23: Mögliche Zuordnung der Platin-bindenden Proteine**

Retentionszeit [min]	Proteinmasse [Da]	Mögliches Protein	Masse mögliches Protein [Da]	Anzahl Pd-Atome	Co- Eluierende Metalle
I	8466	MT	7365	5,6	
II	8446	MT	7365	5,3	
III	8454	MT	7365	5,6	Cu, Zn
IV	6782	Ribosomal protein S9	6148	3,2	
V	10865	Hsp70 Fragment	9493	7	

Palladium zeigt ein dem Platin vergleichbares Elutionsprofil bei Anwendung der identischen Analysenmethode. Die höhere Signalintensität in dem ICP-MS für Platin steht in Einklang mit den Ergebnissen aus der Gesamtmetallbestimmung.



**Abb. 50: Vergleich des Palladium- (oben) und des Platinelutionsprofils (unten) in der ICP-MS nach SEC.**

Auch die TICs von Palladium und Platin exponierten Muschelgewebeextrakten weisen in dem ESI-MS eine hohe Ähnlichkeit auf.

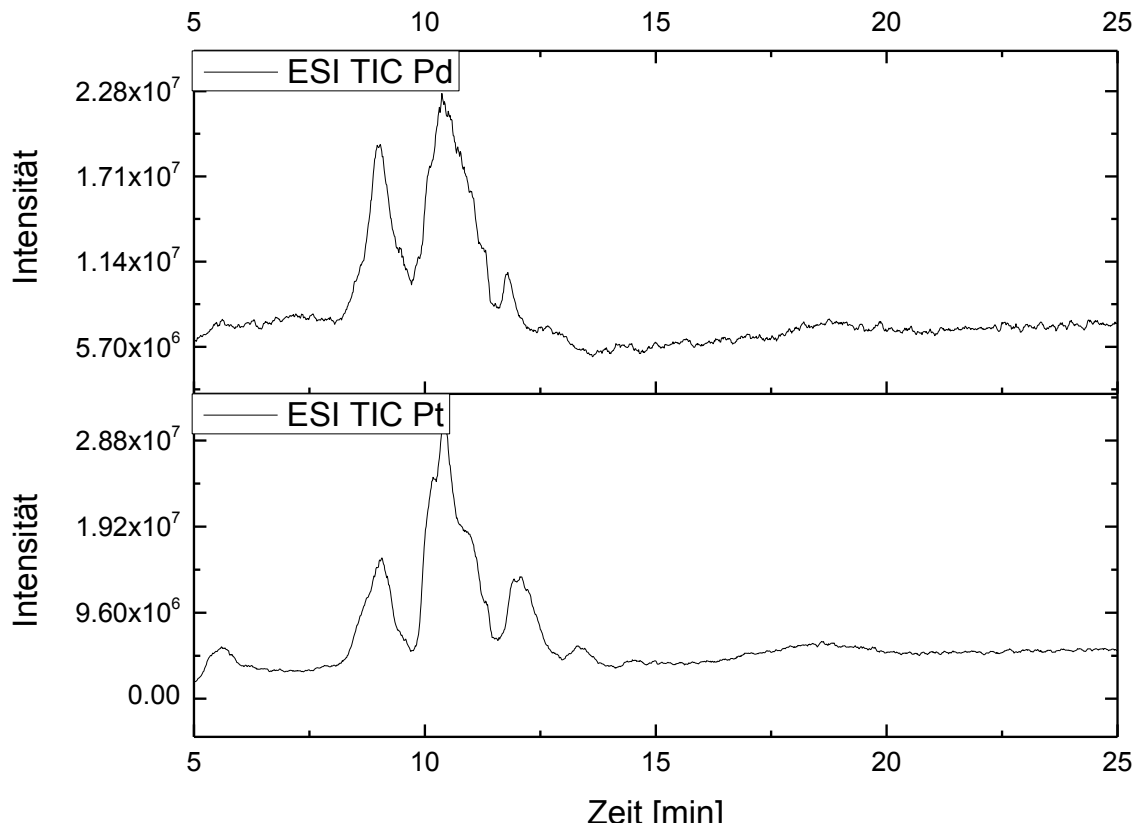


Abb. 51: Vergleich des Palladium- (oben) und des Platinelutionsprofils (unten) in der ESI-MS nach SEC.

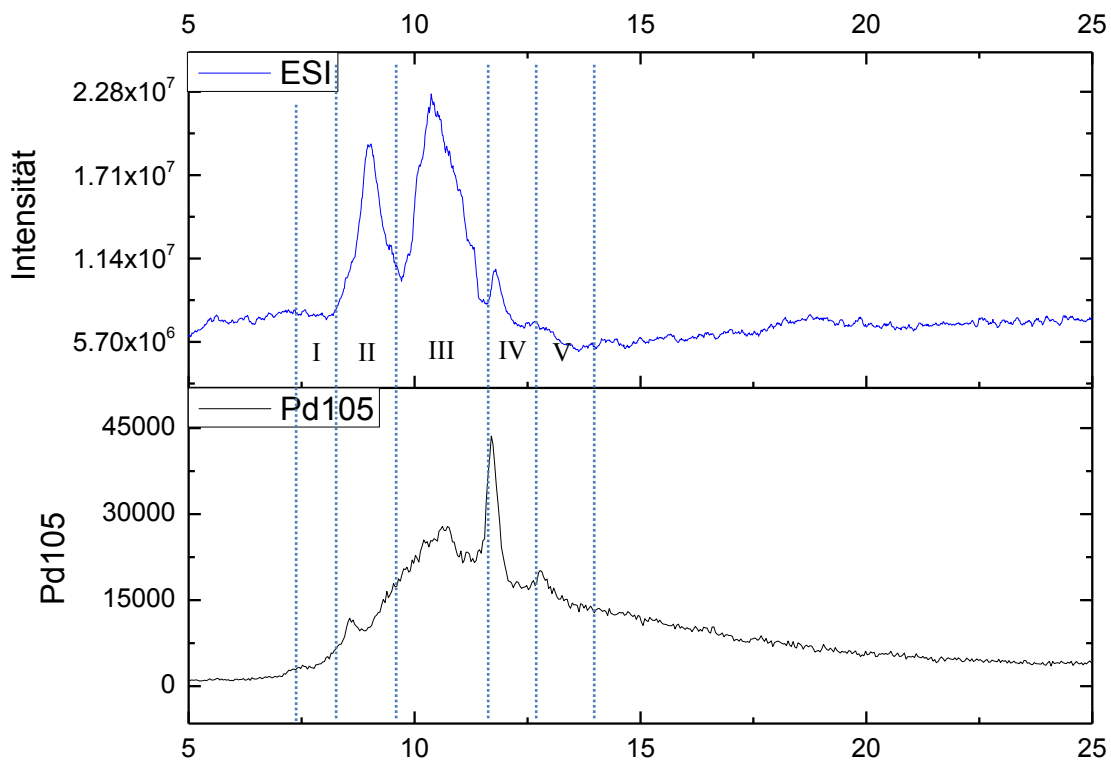


Abb. 52: Korrelation des ESI TICs (oben) mit der Palladium-Spur des ICP-MS (unten) eines Dreikantmuschel Gewebeextrakts gegen Palladium exponierter Individuen.

Die Korrelation von ESI-MS TIC und Palladium-Signal des ICP-MS (Abb. 52) mit anschließender Summation der ESI-Massenspektren über den jeweiligen Peak führt zu ebenfalls fünf Fraktionen, welche wie in Tabelle 24 beschrieben zugeordnet wurden.

**Tabelle 24: Zuordnung möglicher Palladium-Proteinspezies mit Hilfe der UniProt-Datenbank.**

Fraktion	Proteinmasse [Da]	Mögliches Protein	Masse mögliches Protein [Da]	Anzahl Pd-Atome	Co-Eluierende Metalle
I	11792	Putative Heat Shock Protein 90	11457	3,1	
	8456	MT	7364	10,3	
II	8452	MT	7365	10,2	
	8443	MT	7366	10,1	
III		"freies" Pd			
IV	18295	Serine/threonine-protein phosphatase	17476	7,7	Cu
V	9618	Putative Retinoid X Rezeptor	8959	6,2	Cu, Zn
	16776	Alpha-Tubulin	15923	8,0	Cu, Zn
	8557	Cyclophilin A	8411	1,4	Cu, Zn

Eine definitive Identifizierung der Pd- und Pt-bindenden Proteine ist allein aufgrund der intakten Masse nicht möglich. Jedoch erlaubt die intakte Masse eine wahrscheinliche Bestimmung des jeweiligen PGE-Proteins. Bei diesem Top-Down Ansatz ist aufgrund der UniProt Datenbank die theoretische Masse des nicht modifizierten Proteins bekannt. Diese Masse ist allerdings theoretischer Natur, da Proteine in der Regel posttranslationale Modifikationen aufweisen. Dabei kann es sich beispielsweise um Phosphorylierungen, Glykosilierungen oder das Binden eines Metalls handeln, die ebenfalls als Summenparameter in die intakte Proteinmasse einfließen, ohne dass es möglich ist diese Modifikationen zu erkennen. Als Folge dessen sind in Tabelle 23 und

24 nicht-ganzzahlige Metall-Protein-Verhältnisse aufgeführt. Am Beispiel des Cyclophilin A bei den Pd-Muscheln sei gezeigt, dass auch anhand der intakten ESI-Massenspektren eine Zuordnung als Pd-bindenden Protein im *Dreissena Polymorpha* Proteom möglich ist:

Innerhalb eines Peaks werden verschiedene  $m/z$  Werte mit gleichem Ladungszustand gefunden. Unter Berücksichtigung der Ladungszahl folgt für die Massen der ungeladenen Moleküle 8557,64 und 8452,01 Da. Die Differenz der Massen ( $8557,64 - 8452,01 = 105,63$ ) deutet eine Substitution eines Wasserstoffatoms mit der Masse 1,0078 Da gegen ein Palladiumatom mit der Masse 106,42 Da an.

Für die gegen Palladium und Platin exponierten Muscheln konnten verschiedene Proteine als mögliche PGEspezies identifiziert werden. Eine Einordnung in den wissenschaftlichen Kontext soll mit Hilfe der Literatur erfolgen. So ist beispielsweise ein Zusammenhang der Hochregulierung des *alpha*-Tubulins bei oxidativen Stress in der Literatur für die Dreikantmuschel dokumentiert [PEDRIALI et al. 2012].

Auch ist für zahlreiche Organismen die Metallothionein-Antwort auf Metallexposition untersucht. Für die Dreikantmuschel gilt dabei, dass die Metallothioneine bei Metallstress hochreguliert werden und die MTs gleichzeitig als Bindungspartner für die Metalle fungieren [MARIE et al. 2006, IVANKOVIĆ et al. 2008, LECOEUR et al. 2004, FRANK et al. 2008].

Cyclophilin-A ist insbesondere beim Kompostwurm als hochreguliertes Protein bei Metallstress dokumentiert [BRULLE et al. 2007], wohingegen die Expression von Heat-Schock-Proteinen bei PGE Exposition auch für die Dreikantmuschel in der Literatur festgehalten wurde [SINGER et al. 2005].

Die obengenannten Proteine werden in der Regel durch Metalle hochreguliert. Zusammen mit der Tatsache, dass diese über Cysteine verfügen, kommen diese durchaus als Bindungspartner für Platingruppenelemente in Frage.



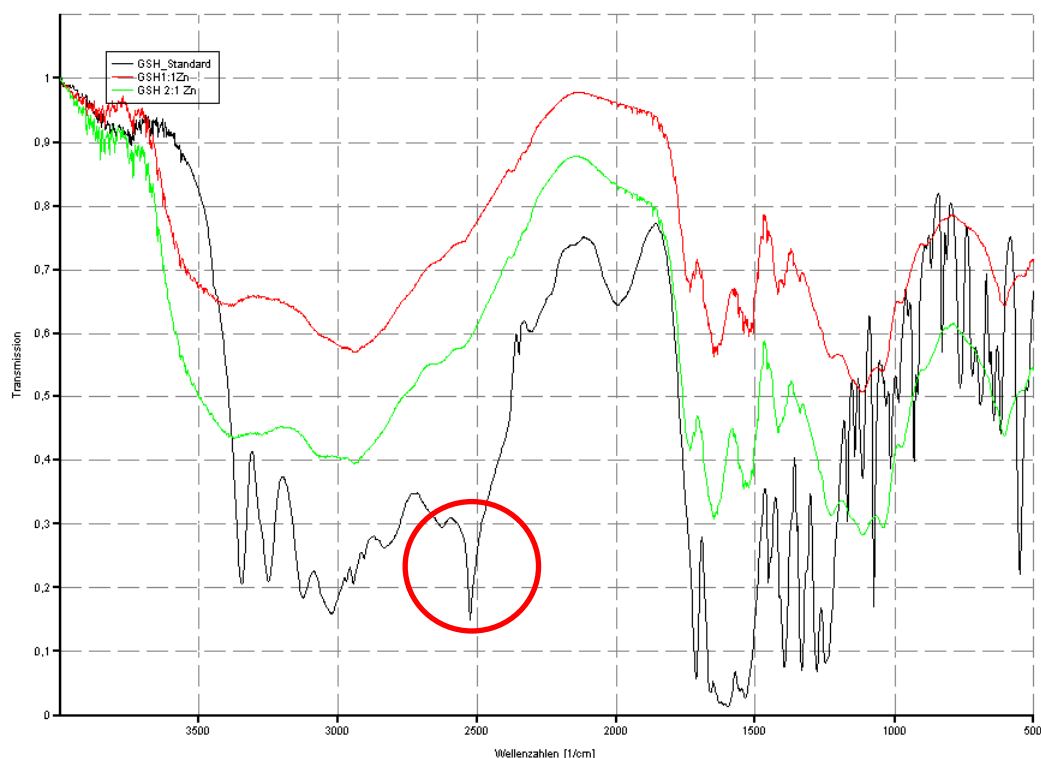
Bei niedermolekularen Verbindungen wäre eine Identifizierung der Metallspezies mit Hilfe der exakten Massenbestimmung und aufgrund des Isotopenmusters möglich; durch Kombinatorik könnte die Summenformel abgeleitet werden. Anschließend könnte in MS/MS-Experimenten durch das Fragmentierungsmuster Aussagen über eine mögliche Struktur getroffen werden.

Bei höhermolekularen Metallspezies wie den Proteinkomplexen ist dieses Vorgehen nicht möglich. Die Kombinationsmöglichkeiten zur Bestimmung der Summenformel werden zu zahlreich, so dass die Anzahl der möglichen Ergebnisse nicht mehr als sinnvoll betrachtet werden kann. Ebenso ist es bei Proteinen nicht ohne weiteres möglich, MS/MS-Experimente an intakten Molekülen durchzuführen: Eine Fragmentierung kann nur schwer erreicht werden und wäre unspezifisch.

Dennoch ist es ein typischer Ansatz in Top-Down basierten Proteomics Studien die intakte Masse einer Proteinspezies zu bestimmen. Zur endgültigen Absicherung der Zuordnung könnten nun weitere Experimente wie beispielsweise die Fraktionierung der einzelnen Proteinpeaks mit anschließendem Verdau mittels Protease erfolgen. Die dann entstehenden Peptide könnten wiederum in MS/MS-Versuchen fragmentiert werden. Mit diesem charakteristischen Fragmentmustern könnte dann abschließend das Protein anhand eines Datenbankabgleichs mit einer Proteindatenbank wie Mascot einwandfrei identifiziert werden.

#### **4.4 Die Rolle des Zinks bei oxidativem Stress**

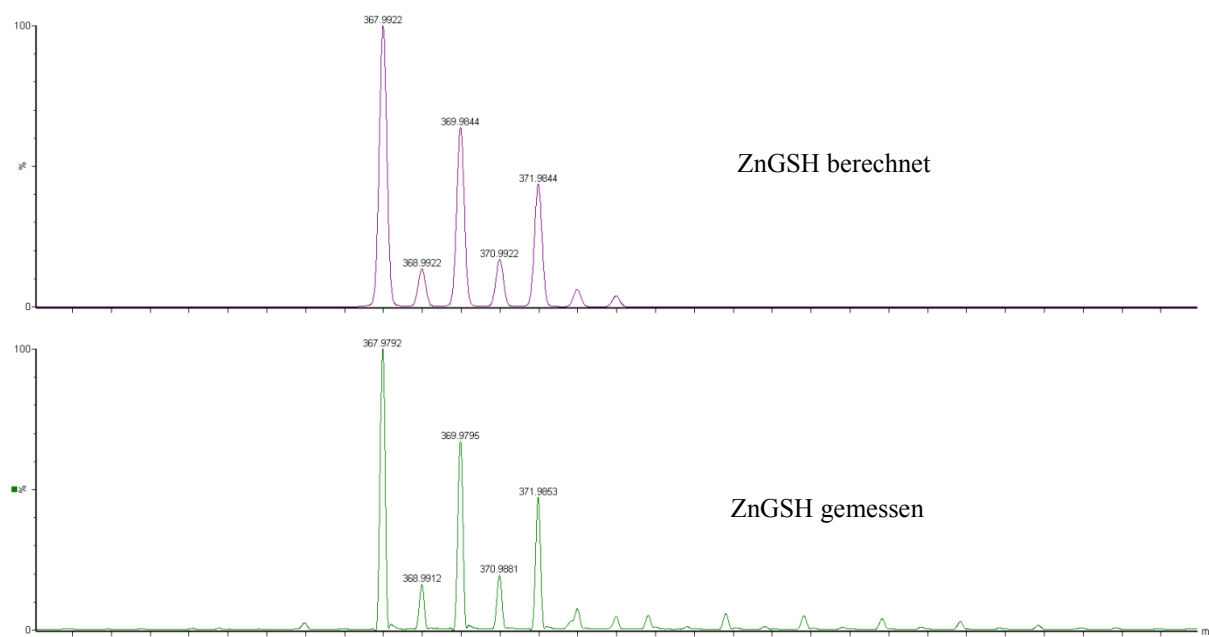
Zur Bestätigung der Bindung des Zinks an den Schwefel des Cysteinyls im Glutathion wurde die IR-Spektroskopie angewandt.



**Abb. 53:** IR-Schwingungsspektren von Glutathion (schwarz) und eines potentiellen Glutathion-Zink-Komplexes. Die Stöchiometrie bei der Reaktion zeigt keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der Verbindung. Das rote Spektrum (Zn-GSH-Verhältnis 1:1) weist gegenüber dem grünen Spektrum (Zn-GSH-Verhältnis 1:2) keine signifikante Veränderung auf. Ebenso kann eine S-H-Valenzschwingung nur im „freien“ Glutathion beobachtet werden (markiert durch den Kreis).

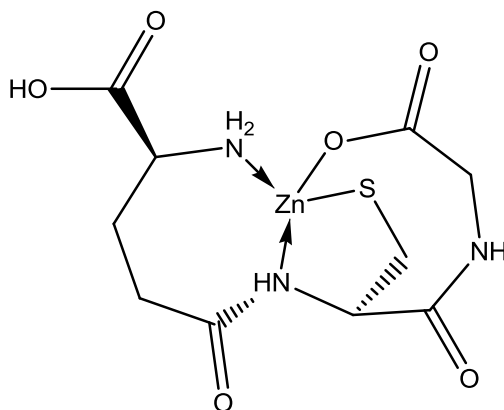
Die Ähnlichkeit des roten und grünen Spektrums aus obiger Abbildung legen nahe, dass trotz unterschiedlicher Stöchiometrie nur eine Zink-GSH-Verbindung entstanden ist. Außerdem deutet das Fehlen der charakteristischen S-H-Valenzschwingung bei einer Wellenzahl von  $2500 - 2600 \text{ cm}^{-1}$  an [HESSE et al. 2005], dass eine Zink-Schwefel-Bindung entsteht.

Dieses Resultat wird durch die Massenspektrometrie bestätigt. Bei den Ansätzen mit unterschiedlicher Stöchiometrie entsteht eine Verbindung mit charakteristischem Zink-Isotopenmuster und einer monoisotopischen Masse von 367,9792 Da.



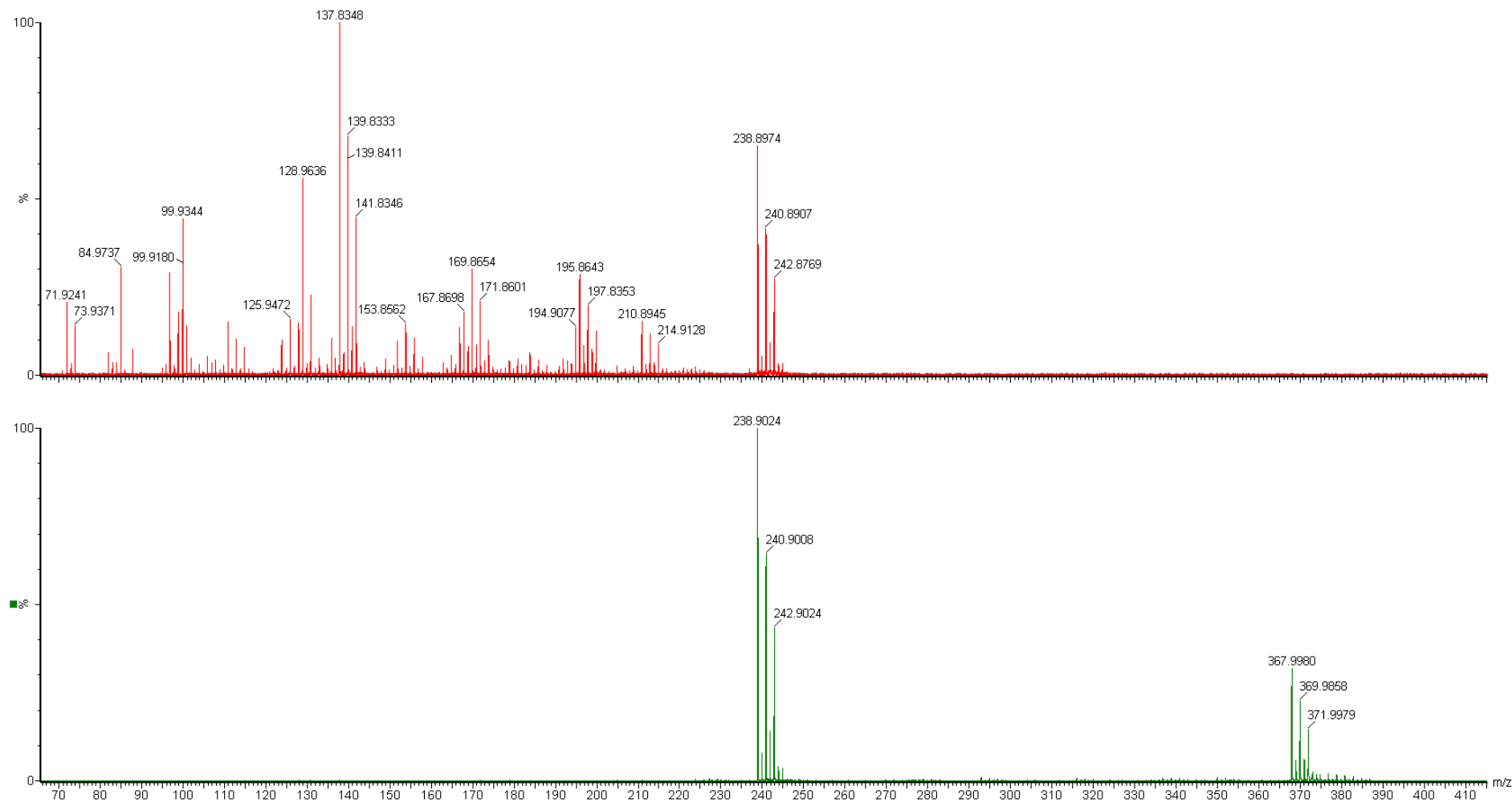
**Abb. 54: Massenspektrum von ZnGSH (unten) im Vergleich zum berechneten Isotopenmusters eines  $C_{10}H_{15}N_3O_6SZn$ -Komplexes (oben).**

Dabei kann durch die zusätzlichen Informationen der Massenspektrometrie folgende Struktur vorgeschlagen werden:

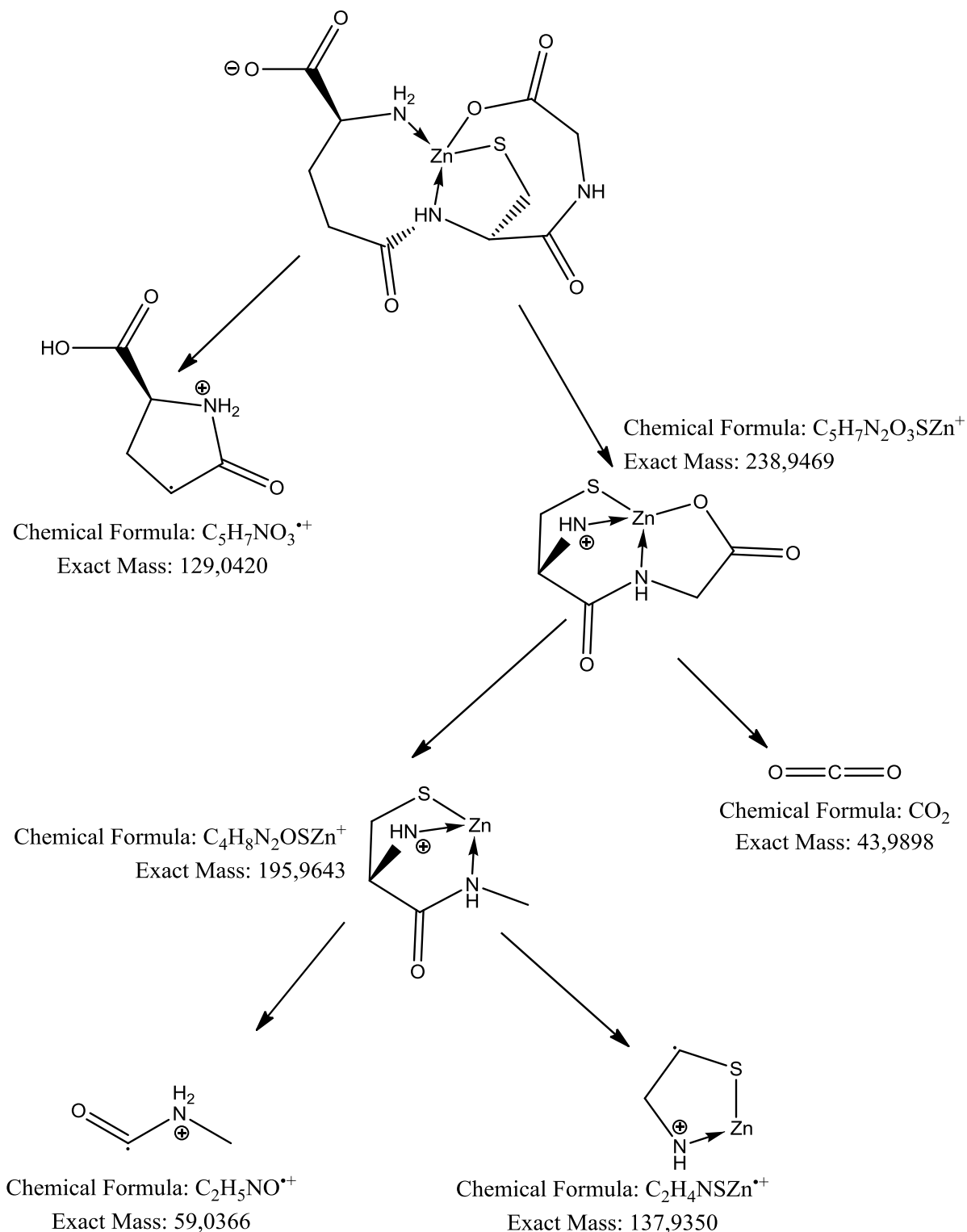


**Abb. 55: Strukturvorschlag für ZnGSH.**

Dieser Vorschlag wird durch mehrdimensionale Massenspektrometrie untermauert. Durch Fragmentierung im Massenspektrometer können weitere Hinweise für den Strukturvorschlag aus Abb. 55 gefunden werden. Ein pseudo-MS<sup>3</sup>-Experiment führt bedingt durch Fragmentierung in der Ionenquelle zur Abspaltung des Glutaminsäurerests ( $m/z = 129,04$ ), so dass ein Fragment mit einer Masse von 238,90 Da und Zink-Isotopenmuster entsteht. Eine weitere Fragmentierung führt zur Decarboxylierung (Verlust der Masse 44 Da). Das resultierende Fragment mit einer Masse von 195,9 Da weist ein Zink-Isotopenmuster auf und kann auch im Massenspektrum identifiziert werden.



**Abb. 56: MS<sup>2</sup> von ZnGSH führt zum Verlust des Glutaminsäurerests mit einer Masse von 129,04 (unten). Eine weitere Fragmentierung (MS<sup>3</sup>) des erhaltenen Ions liefert ein Zink-haltiges Oxazalidinon-Derivat mit einer Masse von 137,83 (oben).**



**Abb. 57: Vorschlag eines Fragmentationsmechanismus für ZnGSH hervorgerufen in einem Massenspektrometer durch kollisionsinduzierte Dissoziation (CID). Die Darstellung von Ladungen und Radikalen erfolgt zum besseren Verständnis. Eine definitive Lokalisierung ist in der Massenspektrometrie nicht möglich.**

Die Wahl eines „pseudo“-MS<sup>3</sup>-Ansatzes zur Erstellung eines Strukturvorschlags für ZnGSH führt zu deutlich detaillierteren Informationen bezüglich des molekularen Aufbaus als ein MS/MS-Experiment (vgl. Abb. 56). Erst auf diese

Weise konnte der verbleibende Rest des Moleküls nach Abspaltung des Glutaminsäure-Fragments beschrieben werden. Der Strukturvorschlag berücksichtigt eine tetraedrische Konfiguration am Zinkatom, wie sie in der Regel in biologischen Zinkkomplexen beobachtet wird [ROE & PANG 1999, MCCALL et al. 2000]. Ebenso ist der Strukturvorschlag gemäß Abb. 55 in Einklang mit dem HSAB-Prinzip.

In der Literatur ist ein abweichender Strukturvorschlag für Zinkglutathion publiziert [KRĘŻEL & BAL 2004]. Krężel und Bal postulieren aufgrund von NMR-spektroskopischen Studien die Bindung eines Wassermoleküls am Zink, sowie eine Komplexierung über den Schwefel, die Carboxylfunktion, sowie den Sauerstoff der Säureamid-Funktion.

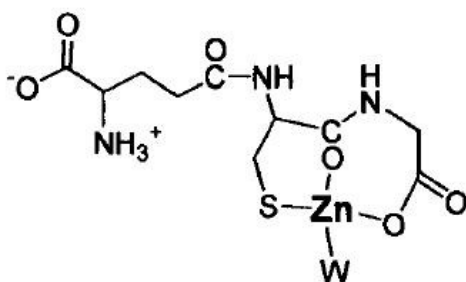
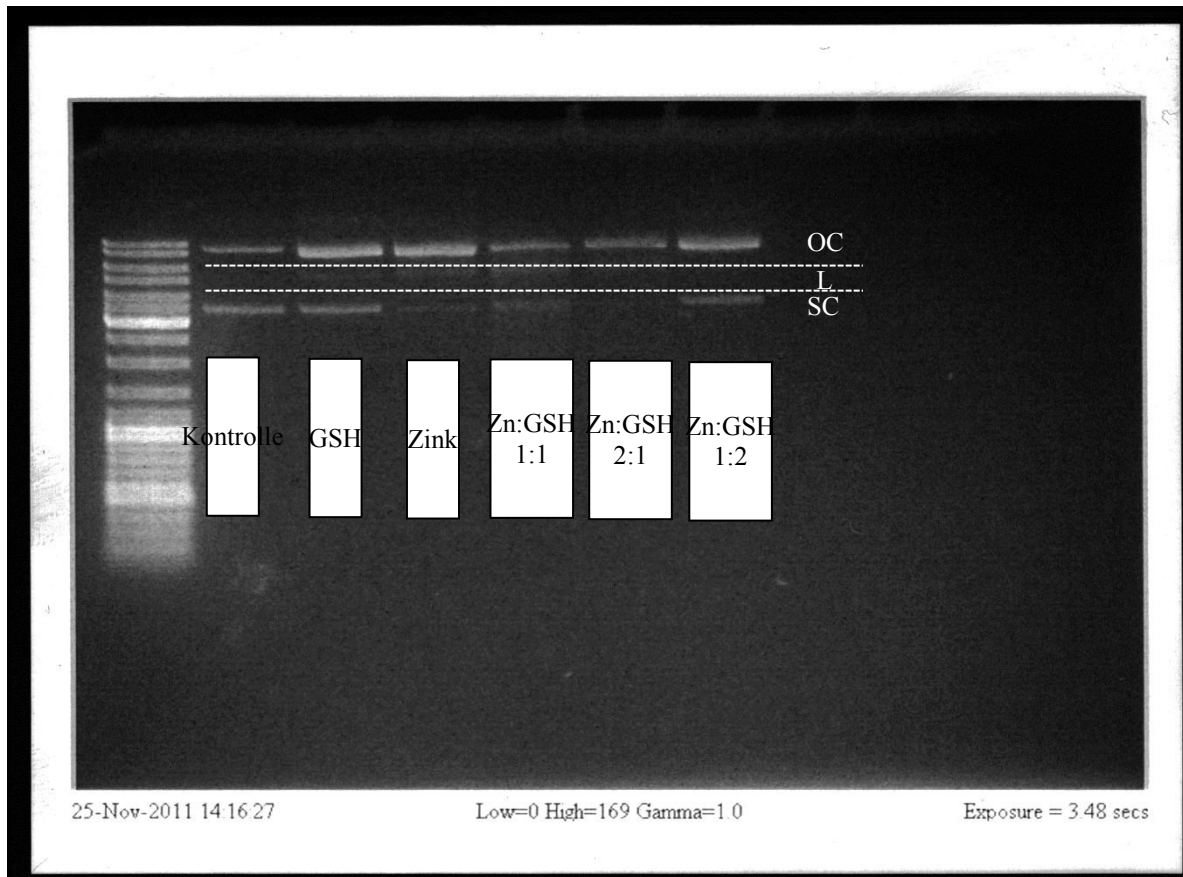


Abb. 58: Postulierte Zinkglutathion-Struktur von Krężel und Bal. Das W symbolisiert ein Wassermolekül (entnommen aus [KRĘŻEL & BAL 2004]).

Die Struktur in Abb. 58 würde im Massenspektrum zu einer um 18 Da erhöhten Molekülmasse führen, da Aquakomplexe bei schonender Ionisierung in der ESI-Quelle nicht zerfallen [CVIJOVI et al. 2012].

Die Resultate der IR-Spektroskopie und der multidimensionalen Massenspektrometrie deuten auf eine Struktur hin, bei der die Thiolgruppe durch Zink blockiert ist. Dadurch kann die Thiolgruppe nicht unter Ausbildung einer Disulfidbrücke oxidiert werden. Folglich kann durch Zink blockierter Schwefel in einer Thiolfunktion nicht zum Abfangen von reaktiven Sauerstoffspezies und anderem oxidativen Stress dienen [POWELL 2000, MARET 1994].

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Resultaten aus den Plasmid-Versuchen. Plasmide liegen in der Regel in der sogenannten „Supercoiled“ (SC) Form vor, die aufgrund ihrer Kompaktheit zu einer weiten Migration in der Gelelektrophorese führt. Kommt es zu Einzelstrangbrüchen gehen diese in eine als „Open Circle“ (OC) bezeichnete Form über, die nur schwer durch das Gel wandert. Doppelstrangbrüche werden durch lineare Fragmente (L) angezeigt.



**Abb. 59:** Gegen verschiedene Zn/GSH-Systeme exponierte Plasmid-DNA. Die Zugabe von Glutathion verringert das Auftreten von Zink-induzierten Strangbrüchen.

In Abb. 59 wird ersichtlich, dass Zink Doppel- und Einzelstrangbrüche an Plasmiden auslösen kann. Bei Anwesenheit von GSH wird dieser Effekt merklich abgeschwächt. Als besonders effektiv kann ein Überschuss an GSH (bezogen auf Zink) angesehen werden. Diese Ergebnisse sind in gutem Einklang mit der Literatur. Die Arbeitsgruppe Black konnte den negativen Einfluss von Zink auf die Vitalität von Endothelzellen nachweisen und gleichzeitig die Schutzfunktion von reduziertem Glutathion aufzeigen [WISEMAN et al. 2010]:

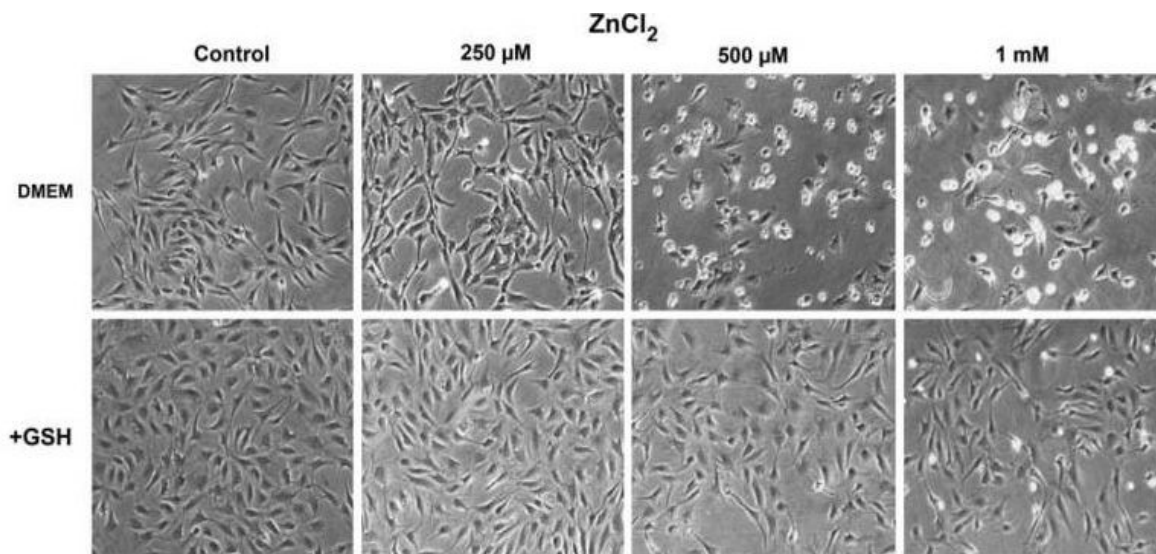


Abb. 60: Endothelzellen in Zellkulturmedium (Dulbecco's Minimal Essential Medium, DMEM) exponiert gegen Zink weisen eine deutlich stärkere Mortalität auf eine Kontrollgruppe, der reduziertes Glutathion zum Medium zugefügt wurde. (Abbildung entnommen aus: [WISEMAN et al. 2010])

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Zink einen hemmenden Einfluss auf die antioxidativen Eigenschaften des Glutathion-Systems ausübt. Dieses ist begründet in der Blockierung der Thiofunktion im reduzierten Glutathion durch Zink.

Eine oxidative oder reduktive Wirkung des Zinks selbst kann ausgeschlossen werden, da das Element Zink über  $[\text{Ar}]3d^{10}4s^2$  Konfiguration der Elektronen verfügt. Die Elektronenkonfiguration zeigt auf, warum Zink nicht redoxaktiv ist und unter physiologischen Bedingungen als  $\text{Zn}^{2+}$  und der damit verbundenen Oxidationsstufe +II auftritt. Bei der Ionisierung werden zwei Elektronen aus dem 4s-Orbital abgegeben; die Energie zur Ionisierung der vollbesetzten 3d-Orbitale ist unter physiologischen Bedingungen nicht erreichbar. Das Zinkion kann dann durch die Ausbildung von vier dativen Bindungen die 18-Elektronenregel erfüllen.

Die katalytische Aktivität des Zinks beruht auf der tetrahedralen Struktur, die während der Katalyse in einen fünffachkoordinierten trigonal-bipyramidalen Komplex übergeht [KLEIFELD et al. 2003].



## 4.5 Metall-induzierter Oxidativer Stress und das Glutathion-Diglutathion-Redoxgleichgewicht

Durch die Verwendung von porösem graphitischem Kohlenstoff als stationäre Phase können die reduzierte und die oxidierte Form des Glutathions ohne Derivatisierung basisliniengetrennt detektiert werden (siehe Abb. 61).

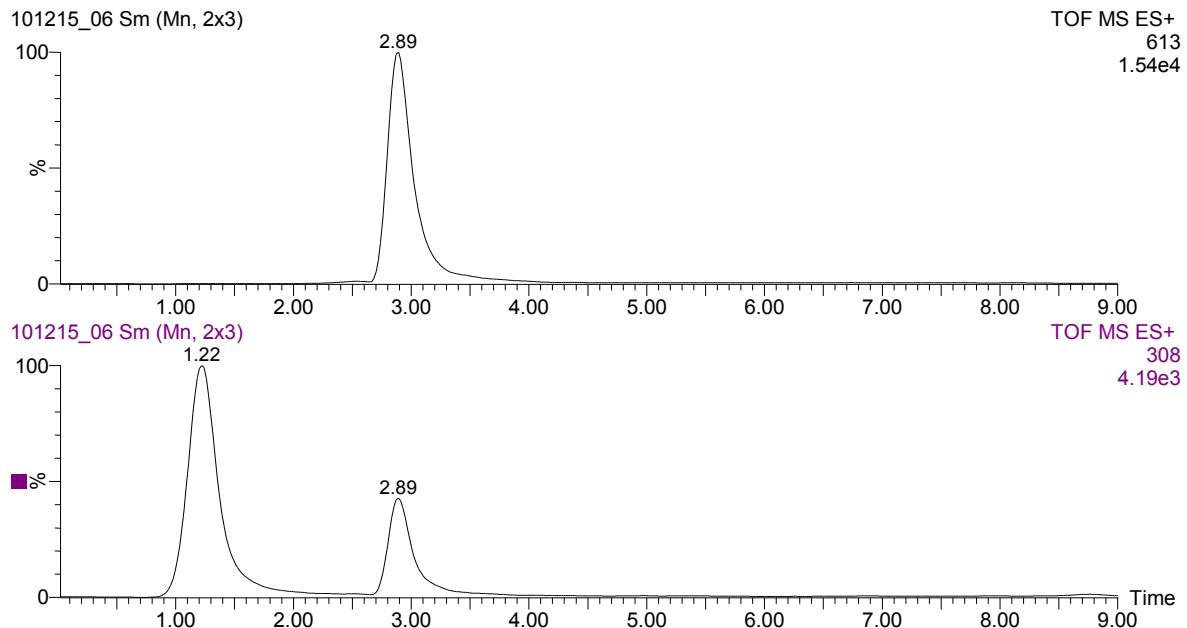
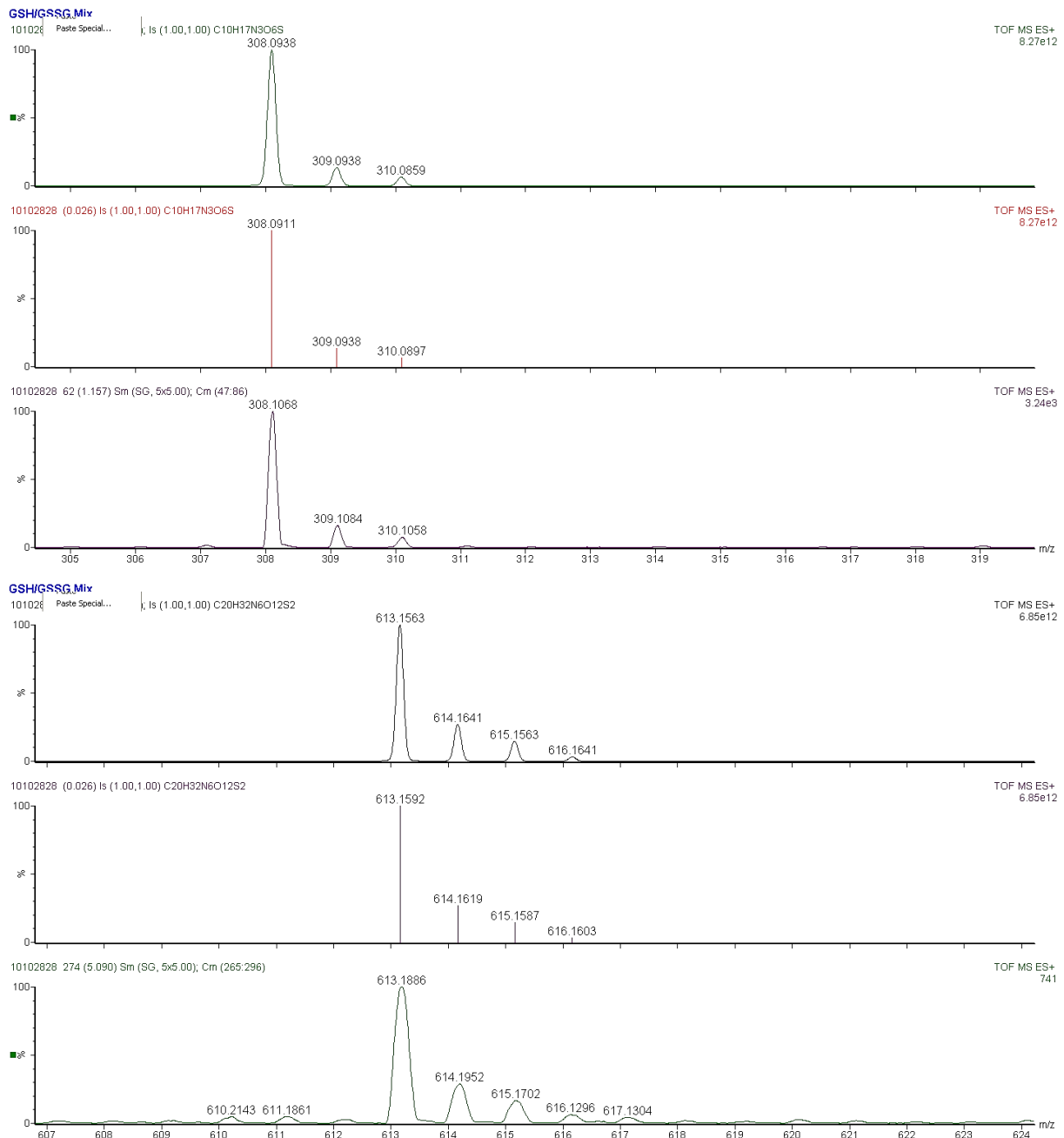


Abb. 61: ESI-qTOF-MS Massenspektren bei  $m/z = 308$  (GSH, unten) und  $m/z=613$  (GSSG, oben).

Die reduzierte Form (GSH) eluiert nach 1,2 min, während das oxidierte GSSG nach 2,9 min registriert wird. Die Identität kann durch einen Vergleich der über den Peak aufsummierten Massenspektren mit den berechneten Isotopenmustern bestätigt werden.



**Abb. 62: Massenspektren von GSH (oben) und GSSG (unten) im Vergleich zu theoretisch berechneten Massenspektren der Verbindungen.**

Der zusätzliche Peak nach 2,89 min in der GSH-Massenspur ist ein Resultat der Ionisierungseigenschaften des GSSG, da ein Teil der Analytmoleküle zweifach ionisiert wird. Dadurch überlagert das zweifach-geladene Dimer die Massenspur des einfach-geladenen Monomers. Dieses ist jedoch durch die chromatographische Trennung nicht von analytischer Relevanz.

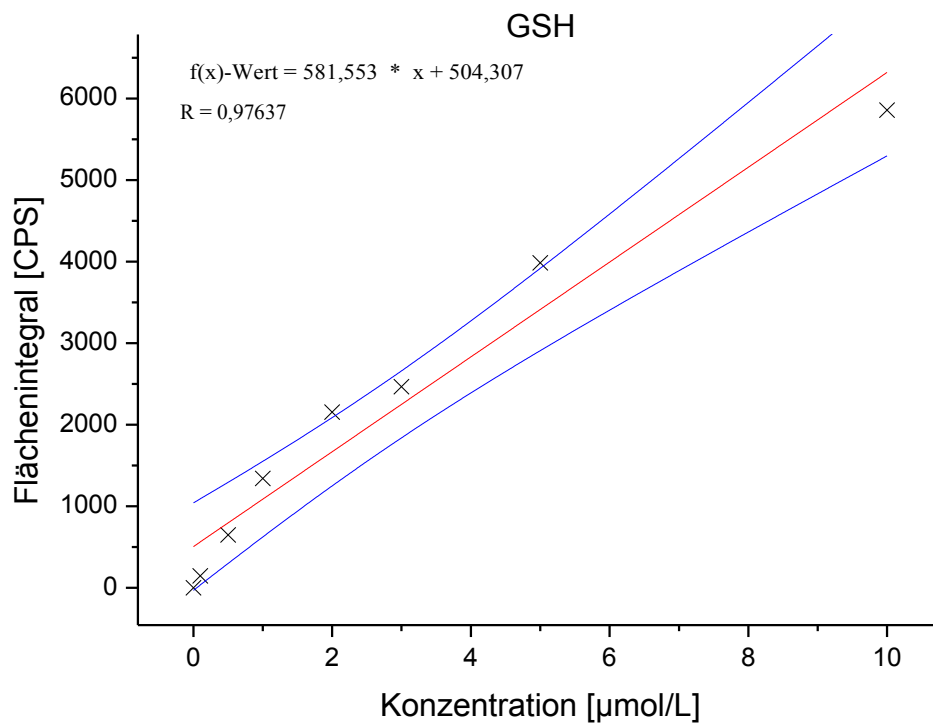
Die Bestimmung der Nachweisgrenze erfolgt aus einer Konzentrationsreihe gemäß der Norm DIN 32645:2008.

Die Integration der Peakflächen führt zu den in Tabelle 25 aufgeführten Werten.

**Tabelle 25: Mittelwerte der Flächenintegrale von GSH und GSSG mit relativer Standardabweichung aus einer Dreifachbestimmung**

Konzentration [μmol/L]	GSH		GSSG	
	Mittelwert Peakfläche	rel. StaAbw. [%]	Mittelwert Peakfläche	rel. StaAbw. [%]
0	---	---	---	---
0,05	---	---	50	16
0,1	146	7	93	5
0,5	647	10	399	5
1	1341	3	789	11
2	2154	1	1467	7
3	2466	4	1722	1
5	3985	3	2778	4
10	5857	0	4865	2

Ein Auftragung der Messpunkte und anschließende lineare Regression führt zu folgenden Ausgleichsgeraden.



**Abb. 63: Regressionsgerade für Glutathion. In blau eingezeichnet ist das 95%-Vertrauensintervall der Geraden.**

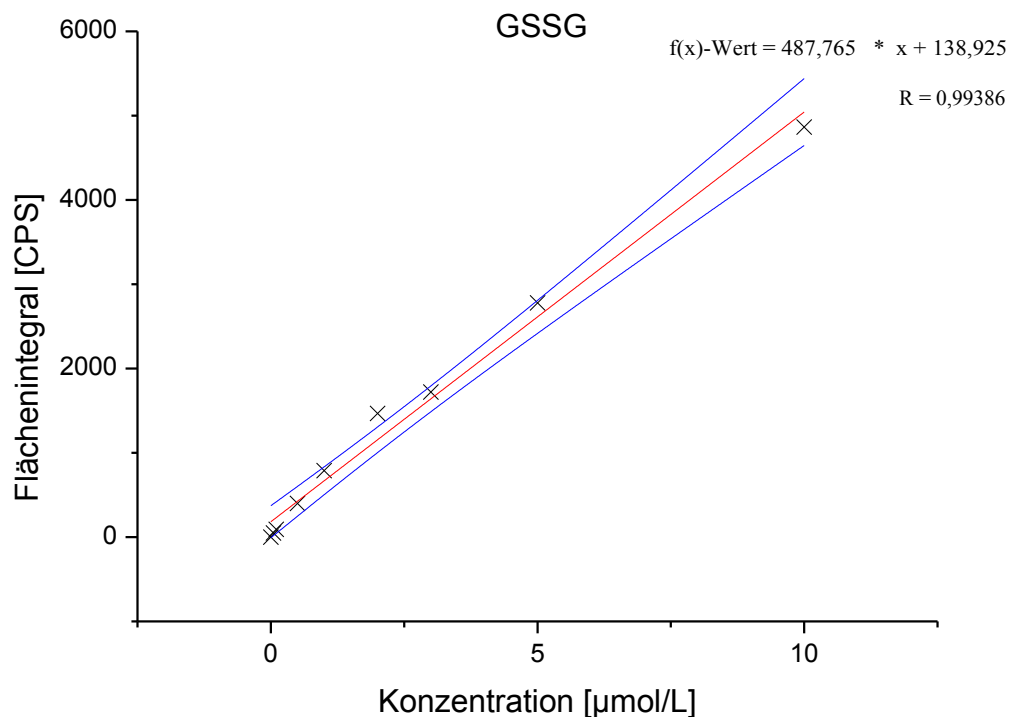


Abb. 64: Regressionsgerade für GSSG. In blau eingezeichnet ist das 95%-Vertrauensintervall der Geraden.

Als Regressionsmodell wurde die lineare Regression gewählt, da die DIN zur Bestimmung der analytischen Kennzahlen und Grenzwerte nur für lineare Zusammenhänge definiert ist. Es sei darauf hingewiesen, dass aufgrund des eingeschränkten linearen dynamischen Bereichs eines Flugzeitmassenspektrometers [KUKLENYIK et al. 2011] oftmals eine quadratische Regression [YNDAL & HANSEN 2003, CASINI et al. 2009] ein genaueres Modell liefert.

Dennoch zeigen die Regressionskoeffizienten R ( $R = 0,97637$  für GSH und  $R = 0,99386$  für GSSG), dass die lineare Regression eine ausreichende Näherung darstellt und zu nachfolgenden Werten führt:

**Tabelle 26: Analytische Kennzahlen und Grenzwerte für die entwickelte Methode zur Bestimmung von oxidiertem und reduziertem Glutathion**

	<b>GSH</b>	<b>GSSG</b>
<b>Kenndaten der Regressionsgeraden</b>		
Steigung a	581,553	486,126
Achsenabschnitt b	504,307	182,042
Korrelationskoeffizient r	0,9764	0,9939
Ergebnisunsicherheit [%]	33,33	33,33
Irrtumswahrscheinlichkeit [%]	1,00	1,00
Anzahl der Messungen n	3	3
Reststandardabweichung $S_y$	472,780	191,005
Verfahrensstandardabweichung $S_x$	0,813	0,393
Summe der Abweichungsquadrate	80,940	87,182
Quantile (einseitig)	3,143	2,998
Quantile (zweiseitig)	3,707	3,499
<b>Analytische Grenzwerte nach DIN 32645</b>		
Nachweisgrenze [ $\mu\text{mol/L}$ ]	1,892	0,842
Erfassungsgrenze [ $\mu\text{mol/L}$ ]	3,784	1,684
Bestimmungsgrenze [ $\mu\text{mol/L}$ ]	8,349	2,754

Aus der Berücksichtigung des Injektionsvolumens von 0,5  $\mu\text{L}$  resultieren die absoluten Grenzwerte aus Tabelle 27 für die Injektion auf die Säule.

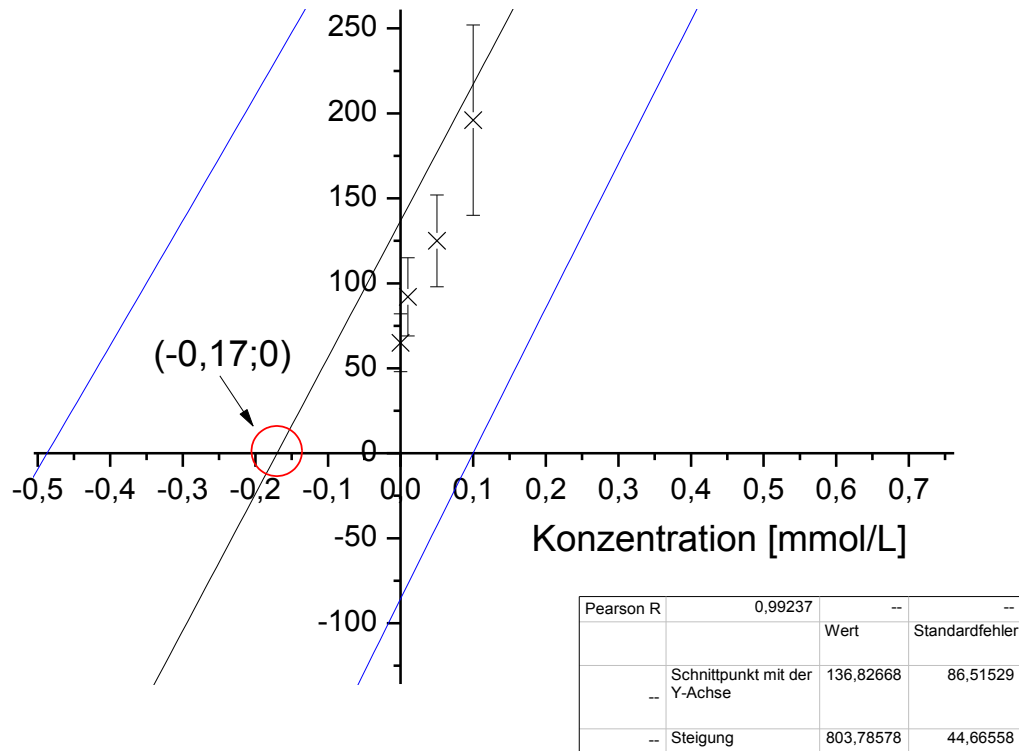
**Tabelle 27: Absolutmengen der analytischen Grenzwerte zur GSH und GSSG-Bestimmung**

<b>Grenzwert</b>	<b>GSH</b>	<b>GSSG</b>
Nachweisgrenze	0,9 pmol	0,4 pmol
Bestimmungsgrenze	4,2 pmol	1,4 pmol

Die Werte aus obiger Tabelle stimmen gut mit den Bestimmungsgrenzen aus der Literatur überein. Dort sind typische Bestimmungsgrenzen im einstelligen bzw. sub-pmol-Bereich der Verbindungen absolut auf der Säule für die LC/ESI-MS angegeben [HAMMERMEISTER et al. 2000, ZHU et al. 2008].

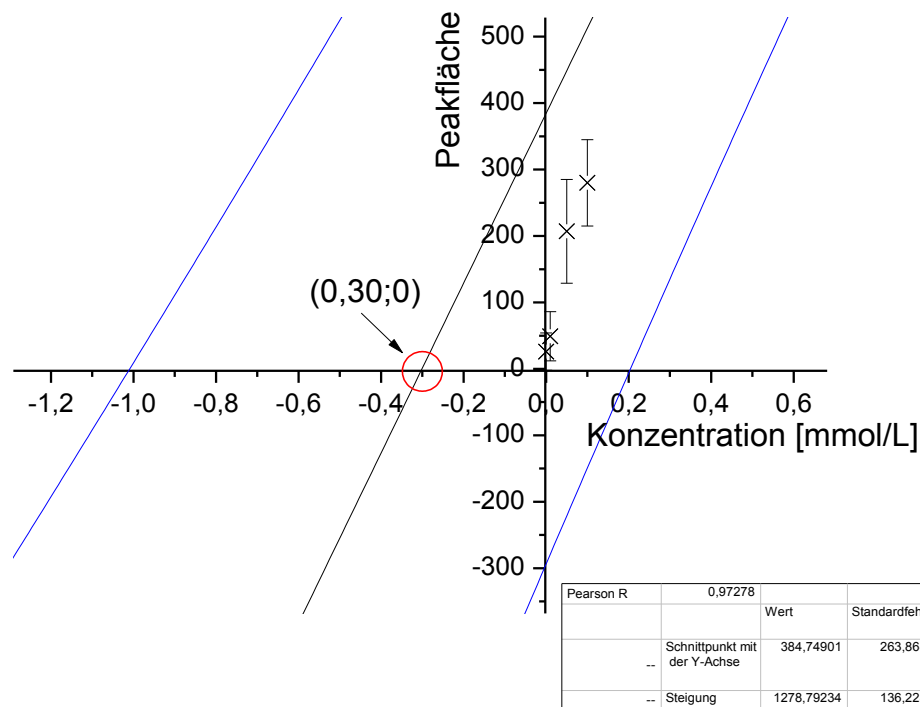
Zur Anwendung der Methode in einer realen Probenmatrix wurden oxidiertes und reduziertes Glutathion in einer Blutplasmaspende mittels Standardadditionsverfahren bestimmt. Aus der Auftragung der Flächenintegrale

und anschließender Erstellung einer Ausgleichsgeraden können die Konzentrationen am Schnittpunkt der Gerade mit der Abszisse abgelesen werden.



**Abb. 65:** Ermittlung der GSH-Konzentration im Standardadditionsverfahren. Am Schnittpunkt mit der Abszisse kann die GSH-Konzentration von 0,17 mmol/L abgelesen werden.

Analog ergibt sich für die Bestimmung des oxidierten Glutathions eine Konzentration von 0,30 mmol/L:



**Abb. 66:** Ermittlung der GSSG-Konzentration im Standardadditionsverfahren. Am Schnittpunkt mit der Abszisse kann die GSSG-Konzentration von 0,30 mmol/L abgelesen werden.

Die Bestimmung von oxidiertem und reduziertem Glutathion aus Blutplasma soll die Matrixtoleranz der Methode zeigen und wurde durchgeführt, da keine zertifizierten Referenzstandards für GSH und GSSG verfügbar sind. Für eine weitreichendere Methodenevaluierung sei auf die Diplomarbeit von Sepideh Ruspic verwiesen [RUSPIC 2011].

Ein Vergleich mit Literaturwerten für Glutathion zeigt besonders für die oxidierte Form eine deutliche Abweichung, wie Tabelle 28 zeigt.

**Tabelle 28:** Vergleich der bestimmten Werte für GSH und GSSG mit Werten aus der Literatur [ROSSI et al. 2002]

GSH gemessen	GSSG gemessen	GSH Literatur	GSSG Literatur
$\mu\text{mol/L}$			
170±17	300±17	30 bis 150	2 bis 6

Die gemessenen Werte stimmen in der Größenordnung, aber nicht im Detail mit den exemplarischen Werten aus der Literatur überein. Dieses entspricht auch den Erwartungen, da bei der Aufarbeitung des Plasmas für die Blutbank Hämolyse der roten Blutkörperchen charakteristisch ist [mündliche Kommunikation der Blutbank des UK Essen]. Die Glutathion-Konzentration in den Erythrozyten ist etwa um den Faktor 500 höher als im Plasma [ROSSI et al. 2002]. Unter diesem Gesichtspunkt liegen die Werte für GSH und GSSG in einer sinnvollen Größenordnung.

Die entwickelte Methode zur gleichzeitigen Bestimmung von oxidierten und reduzierten Glutathion bietet eine nachweisstarke Möglichkeit zur Glutathion-Quantifizierung in komplexen Matrices. Bisherige chromatographische Methoden beruhen auf Derivatisierung mit einem Fluoreszenzmarker für die HPLC/LIF (Laserinduzierte Fluoreszenz) oder eine Defunktionalisierung der Thiolgruppe für die HPLC/MS [IWASAKI et al. 2009]. Neben dem hohen Zeitaufwand bei der Probenvorbereitung bei den o.g. Methoden, kann der Derivatisierungsschritt zur Bildung analytischer Artefakte führen. Insbesondere bei Realproben ist in der Fachliteratur dokumentiert, dass eine Derivatisierung das Glutathiongleichgewicht verändert [ROSSI et al. 2002]. Durch die Defunktionalisierung der Thiolgruppe wird gemäß des „Prinzips des kleinsten Zwangs“ neues reduziertes Glutathion gebildet. Besonders in Realproben wird diese Reaktion durch noch aktive Einheiten Glutathionreduktase katalysiert. Als Konsequenz sind Werte, die auf Derivatisierung beruhen zu gering für GSSG und zu hoch für GSH [ROSSI et al. 2002]. Der Vorteil, der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode, liegt im Gegensatz zu den o.g. Methoden in der Vermeidung eines Eingriffs in das Glutathiongleichgewicht. Weiterhin wird durch die Reduzierung der Probenvorbereitungsschritte die Möglichkeit der Oxidation des GSH verringert.



Damit kann die Methode zur Glutathionbestimmung in einer Vielzahl von Fragestellungen eingesetzt werden. Das Ziel, eine Möglichkeit zur Betrachtung des Metall-induzierten oxidativen Stresses zu entwickeln, konnte erfüllt werden. Die geplante Anwendung auf Gewebe- und Blutproben von Mamakarzinom-Patientinnen des Uniklinikums Essen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden, da es zu einer kurzfristigen Änderung des Studienplans durch Probenengpässe am Uniklinikum kam. Hier wäre eine Korrelation von Zinkgehalten in Tumor und gesundem Gewebe mit dem GSH/GSSG-Verhältnis von Interesse gewesen, um die Rolle des Zinks bei der Tumorgenese besser zu verstehen.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit dieser LC/MS-Methode kann in dem PGE-Projekt liegen. Auch aus dem Muschelweichgewebe können die beiden Formen des Glutathions extrahiert werden, um beispielsweise eine zeitabhängige Antwort des Organismus auf Metallstress durch Palladium und Platin zu untersuchen. Die Stärke der Methode liegt in diesem Fall darin, dass in Kombination mit der SpeedMill und dem LC/MS-Gerät eine gute Automatisierbarkeit und Reproduzierbarkeit der Arbeitsschritte gegeben ist. Folglich können bei einem hohen Probendurchsatz ohne vorherige Kalibrierung relative Veränderung von Glutathion, bzw. des GSH/GSSG-Gleichgewichts bestimmt werden. Dadurch könnte man ein besseres Verständnis der Reaktion des Organismus auf metall-induzierten Stress erhalten.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Hauptziel der Arbeit, die Elementspeziation durch parallele Element- und Molekülmassenspektrometrie nach flüssigchromatographischer Trennung zu etablieren, erfolgreich abgeschlossen werden konnte. Ebenso ist es gelungen, durch den Einsatz eines Membrandesolvators die Kopplungsapparatur „gradientenfähig“ zu machen.

Das aufgebaute System, welches hauptsächlich aus einem ICP-MS und einem hochauflösenden ESI-Massenspektrometer besteht, konnte erfolgreich beim Screening nach PGE-Spezies und der Zuordnung möglicher Platin- und Palladium-Proteinspezies mit Hilfe der Literatur und Proteindatenbanken angewendet werden. Eine definitive Identifizierung dieser Spezies aufgrund von proteolytischem Verdau und anschließender Identifizierung der Verdaupeptide mittels MS/MS hätte den zeitlichen Rahmen und den Umfang der vorliegenden Arbeit gesprengt, da eine aufwendige Fraktionierung mit mehrdimensionaler Chromatographie und anschließender Aufkonzentration der Spezies erfolgen müsste. Daher könnte dieser Vorgang in einer thematisch verwandten anschließenden Arbeit erfolgen.

Als Nebeneffekt des verwendeten Membrandesolvators konnte die Oxidbildungsrate des ICP-MS verringert werden, so dass der Großteil der Interferenzen auf Palladium und Platin in der ICP-MS ausgeblendet werden kann. Dadurch ist eine Quantifizierung der PGE im Ultraspurenbereich auch aus Realmatrices wie Umweltproben möglich, ohne vorab eine Matrixabtrennung durchzuführen, wie durch die Bestimmung von zertifiziertem Referenzmaterial belegt wurde. Dadurch steht mit dem ICP-MS ein robustes und sensitives Analysengerät zur Verfügung, welches ebenso erfolgreich in Anwendungen auf biologisch-medizinischen Bereichen eingesetzt werden konnte. Beispielsweise konnte der Einfluss von Metallen auf die Bildung von oxidativem Stress untersucht werden. Dazu wurde eine LC/MS basierte Methode zur Bestimmung des Gleichgewichts von oxidierten und reduzierten Glutathion entwickelt, die

ohne Derivatisierung der Thiolgruppen auskommt. Weiterhin konnte mit Hilfe von Plasmiden demonstriert werden, inwieweit selbst essentielle Metalle wie Zink, die unter physiologischen Bedingungen nicht-redoxaktiv sind, dennoch zu einer Schädigung der DNA beitragen können.

Auch konnte die Struktur des potentiellen Zink-Glutathion-Komplexes durch mehrdimensionale Massenspektrometrie belegt und somit ein Mechanismus für den Metall-induzierten oxidativen Stress (nämlich die Blockierung der Thiolfunktion in „Scavenger“-Molekülen wie GSH) postuliert werden.

## 6. Literatur

- Online-Kompaktlexikon der Biologie. Wissenschaft Online  
(2012) Muscheln (Bivalvia).  
<http://weichtiere.at/Muscheln/index.html?/Muscheln/einleitung.html>.  
Accessed 22 December 2012
- Amayo KO, Petursdottir A, Newcombe C, Gunnlaugsdottir H, Raab A, Krupp EM, Feldmann J (2011) Identification and Quantification of Arsenolipids Using Reversed-Phase HPLC Coupled Simultaneously to High-Resolution ICPMS and High-Resolution Electrospray MS without Species-Specific Standards. *Anal. Chem.* 83(9):3589–3595
- Andrews SC, Harrison PM, Yewdall SJ, Arosio P, Levi S, Bottke W, Darl M von, Briat J, Laulhère J, Lobreaux S (1992) Structure, function, and evolution of ferritins. *Journal of Inorganic Biochemistry* 47(1):161–174
- Audi G, Bersillon O, Blachot J, Wapstra AH (2003) The Nubase evaluation of nuclear and decay properties: The 2003 NUBASE and Atomic Mass Evaluations. *Nuclear Physics A* 729(1):3–128
- Babula P, Masarik M, Adam V, Eckschlager T, Stiborova M, Trnkova L, Skutkova H, Provaznik I, Hubalek J, Kizek R (2012) Mammalian metallothioneins: properties and functions. *Metallomics* 4(8):739
- Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G (1987) Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem* 22(2):111–180
- Battke F, Leopold K, Maier M, Schmidhalter U, Schuster M (2008) Palladium exposure of barley: uptake and effects. *Plant Biology* 10(2):272–276
- Binelli A, Ricciardi F, Riva C, Provini A (2006) New evidences for old biomarkers: effects of several xenobiotics on EROD and AChE activities in Zebra mussel (*Dreissena Polymorpha*). *Chemosphere* 62(4):510–519
- Bleackley MR, MacGillivray RTA (2011) Transition metal homeostasis: from yeast to human disease. *Biometals* 24(5):785–809
- Bluemlein K, Krupp EM, Feldmann J (2008a) Advantages and limitations of a desolvation system coupled online to HPLC-ICPqMS/ES-MS for the quantitative determination of sulfur and arsenic in arseno-peptide complexes. *J. Anal. At. Spectrom.* 24(1):108

- Bluemlein K, Raab A, Meharg A, Charnock J, Feldmann J (2008b) Can we trust mass spectrometry for determination of arsenic peptides in plants: comparison of LC–ICP–MS and LC–ES-MS/ICP–MS with XANES/EXAFS in analysis of *Thunbergia alata*. *Anal Bioanal Chem* 390(7):1739–1751
- Bremner I (1987) Nutritional and physiological significance of metallothionein. *Experientia Suppl* 52:81–107
- Brulle F, Mitta G, Leroux R, Lemi re S, Lepr tre A, Vandenbulcke F (2007) The strong induction of metallothionein gene following cadmium exposure transiently affects the expression of many genes in *Eisenia fetida*: A trade-off mechanism? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 144(4):334–341
- Cammann K (2001) Instrumentelle analytische Chemie: Verfahren, Anwendungen und Qualit tssicherung. Spektrum-Lehrbuch. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, Berlin
- Camusso M, Balestrini R, Binelli A (2001) Use of zebra mussel (*Dreissena Polymorpha*) to assess trace metal contamination in the largest Italian subalpine lakes. *Chemosphere* 44(2):263–270
- Casini A, Gabbiani C, Michelucci E, Pieraccini G, Moneti G, Dyson PJ, Messori L (2009) Exploring metallodrug–protein interactions by mass spectrometry: comparisons between platinum coordination complexes and an organometallic ruthenium compound. *J Biol Inorg Chem* 14(5):761–770
- Chan KM (1995) Metallothionein: Potential biomarker for monitoring heavy metal pollution in fish around Hong Kong. *Selected Papers from the International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology* 31(4–12):411–415
- Chassaigne H, Vacchina V,  lobi ski R (2000) Elemental speciation analysis in biochemistry by electrospray mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 19(5):300–313
- Cherian MG, Jayasurya A, Bay B (2003) Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutat Res* 533(1-2):201–209
- Cobbett CS (2000) Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Curr Opin Plant Biol* 3(3):211–216

- Connelly NA, O'Neill CR, Knuth BA, Brown TL (2007) Economic Impacts of Zebra Mussels on Drinking Water Treatment and Electric Power Generation Facilities. *Environmental Management* 40(1):105–112
- Copley SD, Dhillon JK (2002) Lateral gene transfer and parallel evolution in the history of glutathione biosynthesis genes. *Genome Biol* 3(5):1-16
- Costello LC, Franklin RB (2006) The clinical relevance of the metabolism of prostate cancer; zinc and tumor suppression: connecting the dots. *Mol Cancer* 5(1):17
- Cunliffe JM, Maloney TD (2007) Fused-core particle technology as an alternative to sub-2- $\mu\text{m}$  particles to achieve high separation efficiency with low backpressure. *J. Sep. Sci.* 30(18):3104–3109
- Cvijovi M, Kilibard V, Jeliki-Stankov M, Lazarevi I, Jakovljevi I, Joksovi L, urevi P (2012) ESI-MS study of speciation in hydrolyzed aluminum chloride solutions. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 23:1087–1097
- da Silva MAO, Sussulini A, Arruda MAZ (2010) Metalloproteomics as an interdisciplinary area involving proteins and metals. *Expert Rev Proteomics* 7(3):387–400
- Diaz-Bone RA, Hollmann M, Wuerfel O, Pieper D (2009) Analysis of volatile arsenic compounds formed by intestinal microorganisms: rapid identification of new metabolic products by use of simultaneous EI-MS and ICP-MS detection after gas chromatographic separation. *J. Anal. At. Spectrom.* 24(6):808
- Dole M, Mack LL, Hines RL, Mobley RC, Ferguson LD, Alice MB (1968) Molecular Beams of Macroions. *J. Chem. Phys.* 49(5):2240–2249
- Edler M, Jakubowski N, Linscheid M (2006) Quantitative determination of melphalan DNA adducts using HPLC - inductively coupled mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 41(4):507–516
- El-Maraghy SA, Gad MZ, Fahim AT, Hamdy MA (2001) Effect of Cadmium and Aluminum Intake on the Antioxidant Status and Lipid Peroxidation in Rat Tissues. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 15(4):207–214
- Feldmann J (1997) Summary of a Calibration Method for the Determination of Volatile Metal(loid) Compounds in Environmental Gas Samples by Using Gas Chromatography?Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 12(9):1069–1076

- Feldmann J, Grümping R, Hirner AV (1994) Determination of volatile metal and metalloid compounds in gases from domestic waste deposits with GC/ICP-MS. *Fresenius J Anal Chem* 350(4-5):228–234
- Fenn JB (1993) Ion formation from charged droplets: roles of geometry, energy, and time. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 4(7):524–535
- Ferrige AG, Seddon MJ, Green BN, Jarvis SA, Skilling J, Staunton J (1992) Disentangling electrospray spectra with maximum entropy. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 6(11):707–711
- Figueiredo-Pereira ME (1998) Disruption of the Intracellular Sulfhydryl Homeostasis by Cadmium-induced Oxidative Stress Leads to Protein Thiolation and Ubiquitination in Neuronal Cells. *Journal of Biological Chemistry* 273(21):12703–12709
- Flassbeck D, Pfeleiderer B, Grümping R, Hirner AV (2001) Determination of Low Molecular Weight Silicones in Plasma and Blood of Women after Exposure to Silicone Breast Implants by GC/MS. *Anal. Chem.* 73(3):606–611
- Foster M, Samman S (2012) Zinc and Regulation of Inflammatory Cytokines: Implications for Cardiometabolic Disease. *Nutrients* 4(12):676–694
- Frank SN, Singer C, Sures B (2008) Metallothionein (MT) response after chronic palladium exposure in the zebra mussel, *Dreissena Polymorpha*. *Environmental Research* 108(3):309–314
- Fridovich I (1974) Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 41(0):35–97
- Gonzalez A, Peters U, Lampe JW, White E (2009) Zinc Intake From Supplements and Diet and Prostate Cancer. *Nutrition and Cancer* 61(2):206–215
- Goodsell D (2004) Catalase. RCSB Protein Data Bank, doi: 10.2210/rcsb\_pdb/mom\_2004\_9
- Grebe M, Pröfrock D, Kakuschke A, Broekaert JAC, Prange A (2011) Absolute quantification of transferrin in blood samples of harbour seals using HPLC-ICP-MS. *Metallomics* 3(2):176

- Gupta S, Singh S, Shukla V (2005) Copper, zinc, and Cu/Zn ratio in carcinoma of the gallbladder. *J. Surg. Oncol.* 91(3):204–208
- Gwosdz K (2012) Methodenentwicklung zur Speziierung von Platin und Palladium in Dreikantmuscheln mittels online-Kopplung von Ultrahochdruckflüssigkeitschromatographie / Elektrospray-Ionisations-Orbitrap-Massenspektrometrie / thermische Membrandesolvatation-induktiv gekoppeltes Plasma-Massenspektrometrie. Vertiefungsarbeit, Universität Duisburg-Essen
- Haase H, Rink L (2009) The immune system and the impact of zinc during aging. *Immun Ageing* 6(1):9
- Hamilton SJ, Mehrle PM (1986) Metallothionein in Fish: Review of Its Importance in Assessing Stress from Metal Contaminants. *Transactions of the American Fisheries Society* 115(4):596–609
- Hammermeister DE, Serrano J, Schmieder P, Kuehl DW (2000) Characterization of dansylated glutathione, glutathione disulfide, cysteine and cystine by narrow bore liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 14(6):503–508
- Harington CR, Mead TH (1935) Synthesis of glutathione. *Biochem. J* 29(7):1602–1611
- Harris HH, Pickering IJ, George GN (2003) The chemical form of mercury in fish. *Science* 301(5637):1203
- Hesse M, Meier H, Zeeh B (2005) Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, 7th edn. Thieme, Stuttgart, New York
- Hirner AV (2006) Speciation of alkylated metals and metalloids in the environment. *Anal Bioanal Chem* 385:555–567
- Hollmann M, Boertz J, Dopp E, Hippler J, Hirner AV (2010) Parallel on-line detection of a methylbismuth species by hyphenated GC/EI-MS/ICP-MS technique as evidence for bismuth methylation by human hepatic cells. *Metallomics* 2(1):52
- Hopkins FG (1921) On an Autoxidisable Constituent of the Cell. *Biochem. J* 15(2):286–0



- Hoppstock K, Sures B (2004) Platinum-Group Metals. In: Merian E, Anke M, Ihnat, M, Stoeppler, M (Eds.): Elements and their compounds in the environment. 2nd Ed, Wiley-VCH, Weinheim, 1047-1086.
- Hu Q, Noll RJ, Li H, Makarov A, Hardman M, Graham Cooks R (2005) The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J. Mass Spectrom.* 40(4):430–443
- Issell BF, MacFadyen BV, Gum ET, Valdivieso M, Dudrick SJ, Bodey GP (1981) Serum zinc levels in lung cancer patients. *Cancer* 47(7):1845–1848
- Ivanković D, Pavičić J, Beatović V, Klobučar RS, Klobučar GIV (2008) Inducibility of metallothionein biosynthesis in the whole soft tissue of zebra mussels *Dreissena polymorpha* exposed to cadmium, copper, and pentachlorophenol. *Environ. Toxicol.*:NA
- Iwasaki Y, Saito Y, Nakano Y, Mochizuki K, Sakata O, Ito R, Saito K, Nakazawa H (2009) Chromatographic and mass spectrometric analysis of glutathione in biological samples. *J CHROMATOGR B* 877:3309–3317
- Jiang L, He L, Fountoulakis M (2004) Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *Journal of Chromatography A* 1023(2):317–320
- Jiang L, Maret W, Vallee BL (1998) The glutathione redox couple modulates zinc transfer from metallothionein to zinc-depleted sorbitol dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(7):3483–3488
- John E, Laskow TC, Buchser WJ, Pitt BR, Basse PH, Butterfield LH, Kalinski P, Lotze MT (2010) Zinc in innate and adaptive tumor immunity. *J Transl Med* 8(1):118
- Johnson LE, Carlton JT (1996) Post-Establishment Spread in Large-Scale Invasions: Dispersal Mechanisms of the Zebra Mussel *Dreissena Polymorpha*. *Ecology* 77(6):1686–1690
- Keele BB, JR, McCord JM, Fridovich I (1970) Superoxide dismutase from escherichia coli B. A new manganese-containing enzyme. *J Biol Chem* 245(22):6176–6181
- Kim S, Rodgers RP, Marshall AG (2006) Truly “exact” mass: Elemental composition can be determined uniquely from molecular mass measurement at ~0.1 mDa accuracy for molecules up to ~500 Da. *ULTRA-ACCURATE MASS SPECTROMETRY AND RELATED TOPICS*

Dedicated to H.-J. Kluge on the occasion of his 65th birthday anniversary  
Jürgen Kluge Special Issue 251(2–3):260–265

Kingdon K (1923) A Method for the Neutralization of Electron Space Charge by Positive Ionization at Very Low Gas Pressures. *Phys. Rev.* 21(4):408–418

Kleinfeld O, Frenkel A, Martin JML, Sagi I (2003) Active site electronic structure and dynamics during metalloenzyme catalysis. *Nat Struct Biol* 10(2):98–103

Knight RD (1981) Storage of ions from laser-produced plasmas. *Applied Physics Letters* 38(4):221–223

Kösters J, Hippler J, Diaz-Bone RA, Hirner AV (2005) Parallel ICP-MS and EI-MS detection after GC separation as a unique tool for simultaneous identification and quantification of volatile heteroatomic organic compounds. *J. Anal. At. Spectrom.* 20(9):996

Kreżel A, Bal W (2004) Studies of Zinc(II) and Nickel(II) Complexes of GSH, GSSG and Their Analogs Shed More Light on Their Biological Relevance. *Bioinorganic Chemistry and Applications* 2(3-4):293–305

Krupp EM, Milne BF, Mestrot A, Meharg AA, Feldmann J (2008) Investigation into mercury bound to biothiols: structural identification using ESI–ion-trap MS and introduction of a method for their HPLC separation with simultaneous detection by ICP-MS and ESI-MS. *Anal Bioanal Chem* 390(7):1753–1764

Kryger J, Riisgård H (1988) Filtration rate capacities in 6 species of European freshwater bivalves. *Oecologia* 77(1):34–38

Kuklenyik Z, Boyer AE, Lins R, Quinn CP, Gallegos-Candela M, Woolfitt A, Pirkle JL, Barr JR (2011) Comparison of MALDI-TOF-MS and HPLC-ESI-MS/MS for Endopeptidase Activity-Based Quantification of Anthrax Lethal Factor in Serum. *Anal. Chem.* 83(5):1760–1765

Kwan KHM, Chan HM, Lafontaine Y de (2003) Metal contamination in zebra mussels (*Dreissena Polymorpha*) along the St. Lawrence River. *Environ Monit Assess* 88(1-3):193–219

Lafontaine Y de, Gagné F, Blaise C, Costan G, Gagnon P, Chan HM (2000) Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena Polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquatic Toxicology* 50(1–2):51–71

- Lecoeur S, Videmann B, Berny P (2004) Evaluation of metallothionein as a biomarker of single and combined Cd/Cu exposure in *Dreissena polymorpha*. *Environmental Research* 94(2):184–191
- Leopold K, Maier M, Weber S, Schuster M (2008) Long-term study of palladium in road tunnel dust and sewage sludge ash. *Environmental Pollution* 156(2):341–347
- Livingstone DR (1993) Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 57(3):195–211
- Löffler G (2008) Basiswissen Biochemie: Mit Pathobiochemie, 7th edn. Springer Medizin Verlag, Heidelberg
- Loo JA, Loo RRO, Udseth HR, Edmonds CG, Smith RD (1991) Solvent-induced conformational changes of polypeptides probed by electrospray-ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 5(3):101–105
- Lottspeich F, Engels JW (2006) Bioanalytik, 2nd edn. Elsevier, Spektrum, Akad. Verl., München ;, Heidelberg
- Lu Y, Yeung N, Sieracki N, Marshall NM (2009) Design of functional metalloproteins. *Nature* 460(7257):855–862
- Luschützky EF (2005) Schwermetallbelastung von *Dreissena Polymorpha* in Donau und Drau und ihre Bedeutung als Bioindikator. *UWSF - Z Umweltchem Ökotox* 17(2):68–76
- Makarov A (2000) Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis. *Anal. Chem.* 72(6):1156–1162
- Mallet CR, Lu Z, Mazzeo JR (2004) A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18(1):49–58
- Mann S, Bannister JV, Williams RJ (1986) Structure and composition of ferritin cores isolated from human spleen, limpet (*Patella vulgata*) hemolymph and bacterial (*Pseudomonas aeruginosa*) cells. *J Mol Biol* 188(2):225–232
- Marie V, Gonzalez P, Baudrimont M, Bourdineaud J, Boudou A (2006) Metallothionein response to cadmium and zinc exposures compared in two

- freshwater bivalves, *Dreissena polymorpha* and *Corbicula fluminea*. *Biomaterials* 19(4):399–407
- Maret W (1994) Oxidative metal release from metallothionein via zinc-thiol/disulfide interchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91(1):237–241
- Maret W (2000) The Function of Zinc Metallothionein: A Link between Cellular Zinc and Redox State. *The Journal of Nutrition* 130(5):1455S–1458S
- Maret W (2011) Metals on the move: zinc ions in cellular regulation and in the coordination dynamics of zinc proteins. *Biomaterials* 24(3):411–418
- Margalioth EJ, Schenker JG, Chevion M (1983) Copper and zinc levels in normal and malignant tissues. *Cancer* 52(5):868–872
- Margoshes M, Vallee BL (1957) A Cadmium Protein from Equine Kidney Cortex. *J. Am. Chem. Soc.* 79(17):4813–4814
- Martin ME, Byers BR, Olson MO, Salin ML, Arceneaux JE, Tolbert C (1986) A *Streptococcus mutans* superoxide dismutase that is active with either manganese or iron as a cofactor. *J Biol Chem* 261(20):9361–9367
- McCall KA, Huang C, Fierke CA (2000) Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *J Nutr* 130(5S Suppl):1437S–46S
- Michalke B (2003) Element speciation definitions, analytical methodology, and some examples. Special Issue on Methodologies for Assessing Exposures to Metals: Speciation, Bioaccessibility and Bioavailability in the Environment, Food and Feed 56(1):122–139
- Michalke B, Schramel O, Kettrup A (1999) Capillary electrophoresis coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (CE/ICP-MS) and to electrospray ionization mass spectrometry (CE/ESI-MS): An approach for maximum species information in speciation of selenium. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 363(5-6):456–459
- Michalski K (2010) Entwicklung von nativen HPLC/ICP-MS Trennmethoden für Metallproteine. Vertiefungsarbeit, Universität Duisburg-Essen
- Michalski K (2011) Entwicklung einer nativen 2-Dimensionalen HPLC/ICP-MS Methode zur Bestimmung von Metallothionein. Diplomarbeit, Universität Duisburg-Essen

- Miyazaki H, Oka N, Koga A, Ohmura H, Ueda T, Imaizumi T (2006) Comparison of gene expression profiling in pressure and volume overload-induced myocardial hypertrophies in rats. *Hypertens Res* 29(12):1029–1045
- Mourgaud Y, Martinez É, Geffard A, Andral B, Stanisiere J, Amiard J (2002) Metallothionein concentration in the mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of response to metal contamination: validation in the field. *Biomarkers*. *Biomarkers* 7(6):479–490
- Mozziconacci O, Sharov V, Williams TD, Kerwin BA, Schöneich C (2008) Peptide Cysteine Thiyl Radicals Abstract Hydrogen Atoms from Surrounding Amino Acids: The Photolysis of a Cystine Containing Model Peptide. *J. Phys. Chem. B* 112(30):9250–9257
- Müller M, Heumann KG (2000) Isotope dilution inductively coupled plasma quadrupole mass spectrometry in connection with a chromatographic separation for ultra trace determinations of platinum group elements (Pt, Pd, Ru, Ir) in environmental samples. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 368(1):109–115
- Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM (2008) *Lehninger principles of biochemistry*, 5th edn. W.H. Freeman, New York
- Nguyen S, Fenn JB (2007) Gas-phase ions of solute species from charged droplets of solutions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(4):1111–1117
- Niemelä M, Kola H, Perämäki P, Piispanen J, Poikolainen J (2005) Comparison of Microwave-Assisted Digestion Methods and Selection of Internal Standards for the Determination of Rh, Pd and Pt in Dust Samples by ICP-MS: *Microchimica Acta* 150(3-4):211-217
- Nischwitz V, Michalke B, Kettrup A (2003) Identification and quantification of metallothionein isoforms and superoxide dismutase in spiked liver extracts using HPLC-ESI-MS offline coupling and HPLC-ICP-MS online coupling. *Anal Bioanal Chem* 375(1):145–156
- Nordsieck R, Die lebende Welt der Weichtiere. <http://weichtiere.at/Muscheln/index.html?/Muscheln/einleitung.html>. Zuletzt geprüft am 30.12.20012
- Ouvry-Patat SA, Torres MP, Gelfand CA, Quek HH, Easterling M, Speir JP, Borchers CH (2009) Top-Down Proteomics on a High-field Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometer, vol 492, pp 215–231

- Patricia J. Loferski (2011) 2011 Minerals Yearbook: Platinum-Group Metals. [Advance Release]. Minerals Yearbook, Pittsburgh, PA
- Paul W, Reinhard HP, Zahn U (1958) Das elektrische Massenfilter als Massenspektrometer und Isotopentrenner. Z. Physik 152(2):143–182
- Pearson RG (1968) Hard and soft acids and bases, HSAB, part 1: Fundamental principles. J. Chem. Educ. 45(9):581
- Pedriali A, Riva C, Parolini M, Cristoni S, Sheehan D, Binelli A (2012) A redox proteomic investigation of oxidative stress caused by benzoylecgonine in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. Drug Test. Analysis:n/a
- Pereira L (2008) Porous Graphitic Carbon as a Stationary Phase in HPLC: Theory and Applications. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 31(11-12):1687–1731
- Perry RH, Cooks RG, Noll RJ (2008) Orbitrap mass spectrometry: Instrumentation, ion motion and applications. Mass Spectrom. Rev. 27(6):661–699
- Piotrowski J, Trojanowska B, Sapota A (1974) Binding of cadmium and mercury by metallothionein in the kidneys and liver of rats following repeated administration: Archives of Toxicology 32(4):351-360
- Powell SR (2000) The Antioxidant Properties of Zinc. The Journal of Nutrition 130(5):1447S-1454S
- Prange A, Pröfrock D (2005) Application of CE–ICP–MS and CE–ESI–MS in metalloproteomics: challenges, developments, and limitations. Anal Bioanal Chem 383(3):372–389
- Prasad AS, Beck FW, Doerr TD, Shamsa FH, Penny HS, Marks SC, Kaplan J, Kucuk O, Mathog RH (1998) Nutritional and zinc status of head and neck cancer patients: an interpretive review. J Am Coll Nutr 17(5):409–418
- Prasad AS, Beck FW, Grabowski SM, Kaplan J, Mathog RH (1997) Zinc deficiency: changes in cytokine production and T-cell subpopulations in patients with head and neck cancer and in noncancer subjects. Proc Assoc Am Physicians 109(1):68–77
- Rabieh S, Hirner AV, Matschullat J (2008) Determination of arsenic species in human urine using high performance liquid chromatography (HPLC) coupled

- with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 23(4):544–549
- Reichl F (2009) *Taschenatlas Toxikologie*, 3rd edn. Thieme, Stuttgart
- Richardson J, Thomas KA, Rubin BH, Richardson DC (1975) Crystal structure of bovine Cu,Zn superoxide dismutase at 3 Å resolution: chain tracing and metal ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(4):1349–1353
- Richarz A, Bratter P (2002) Speciation analysis of trace elements in the brains of individuals with Alzheimer's disease with special emphasis on metallothioneins. *Anal Bioanal Chem* 372(3):412–417
- Roe RR, Pang Y (1999) Zinc's Exclusive Tetrahedral Coordination Governed by Its Electronic Structure. *J Mol Model* 5(7-8):134-140
- Rosbach M, Schlodt JD, Ostapczuk P (1992) *Specimen banking: Environmental monitoring and modern analytical approaches*. Springer-Verlag, Berlin, New York
- Rossi R, Milzani A, Dalle-Donne I, Giustarini D, Lusini L, Colombo R, Di Simplicio P (2002) Blood glutathione disulfide: in vivo factor or in vitro artifact? *Clin Chem* 48(5):742–753
- Rotchell JM, Clarke KR, Newton LC, Bird DJ (2001) Hepatic metallothionein as a biomarker for metal contamination: age effects and seasonal variation in European flounders (*Pleuronectes flesus*) from the Severn Estuary and Bristol Channel. *Marine Environmental Research* 52(2):151–171
- Ruspic S (2011) *Validierung einer flüssigchromatographischen Methode zur Bestimmung biologisch relevanter Verbindungen*, Universität Duisburg-Essen
- Sato M, Bremner I (1993) Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radical Biology and Medicine* 14(3):325–337
- Schlag P, Seeling W, Merkle P, Betzler M (1978) Veränderungen des Serumzinks beim Mammacarcinom. *Langenbecks Arch Chiv* 346(2):129–133
- Schramel O, Michalke B, Kettrup A (1999) Capillary electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry (CE/ESI-MS) as a powerful tool for trace element speciation. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 363(5-6):452–455

- Schwartz MK (1975) Role of trace elements in cancer. *Cancer Res* 35(11 Pt. 2):3481–3487
- Schwedt G (2008) *Analytische Chemie: Grundlagen, Methoden und Praxis*, 2nd edn. Master. Wiley-VCH-Verl., Weinheim
- Sekler I, Sensi S, Hershfinkel MSW (2007) Mechanism and Regulation of Cellular Zinc Transport. *Mol. Med.* 13(7-8):1
- Siethoff C, Feldmann I, Jakubowski N, Linscheid M (1999) Quantitative determination of DNA adducts using liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry and liquid chromatography/high-resolution inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 34(4):421–426
- Sigel A, Sigel H, Sigel RKO (2009) *Metallothioneins and Related Chelators*, vol 5. Royal Society of Chemistry, Cambridge
- Singer C, Zimmermann S, Sures B (2005) Induction of heat shock proteins (hsp70) in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) following exposure to platinum group metals (platinum, palladium and rhodium): comparison with lead and cadmium exposures. *Aquat Toxicol* 75(1):65–75
- Sures B, Singer C, Zimmermann S (2006) Biological Effects of Palladium. In: Zereini F, Alt F (eds) *Palladium Emissions in the Environment*. Springer Berlin Heidelberg, pp 489–499
- Thermo Scientific (2004a) *HPLC Analysis of Biomolecules Technical Guide: Successful Separations of Peptides, Proteins and Other Biomolecules*
- Thermo Scientific (2004b) *Hypercarb HPLC columns: Technical Guide*
- Thermo Scientific (2009) *Hypercarb Columns. Applications Notebook*
- Thirumoorthy N, Shyam Sunder A, Manisenthil Kumar KT, Senthil kumar M, Ganesh GN, Chatterjee M (2011) A Review of Metallothionein Isoforms and their Role in Pathophysiology. *World J Surg Onc* 9(1):54
- Tipton JD, Tran JC, Catherman AD, Ahlf DR, Durbin KR, Kelleher NL (2011) Analysis of Intact Protein Isoforms by Mass Spectrometry. *Journal of Biological Chemistry* 286(29):25451–25458



- Tschesche H, Dietl T (1975) The Amino-Acid Sequence of Isoinhibitor K from Snails (*Helix pomatia*). A Sequence Determination by Automated Edman Degradation and Mass-Spectral Identification of the Phenylthiohydantoins. *Eur J Biochem* 58(2):439–451
- Tümping W v. (1991) DAUNDERER, M.: Handbuch der Umweltgifte - Klinische Umwelttoxikologie für die Praxis. Landsberg/Lech, ecomed, 1990, Loseblattwerk in Leinenordner, DM 98,-, Ergänzungslieferungen DM 0,36 je Seite, ISBN 3-609-711-20-5. *Acta hydrochim. hydrobiol.* 19(5):516
- Uroic MK, Krupp EM, Johnson C, Feldmann J (2009) Chemotrapping-atomic fluorescence spectrometric method as a field method for volatile arsenic in natural gas. *J. Environ. Monit.* 11(12):2222
- van Deemter JJ, Zuiderweg FJ, Klinkenberg A (1956) Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. *Chemical Engineering Science* 5(6):271–289
- Vollmer SH, Mende-Mueller LM, Miziorko HM (1988) Identification of the site of acetyl-S-enzyme formation on avian liver mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase. *Biochemistry* 27(12):4288–4292
- Waldron KJ, Rutherford JC, Ford D, Robinson NJ (2009) Metalloproteins and metal sensing. *Nature* 460(7257):823–830
- Weisiger RA, Fridovich I (1973) Superoxide dismutase. Organelle specificity. *J Biol Chem* 248(10):3582–3592
- Wind M, Wesch H, Lehmann WD (2001) Protein Phosphorylation Degree: Determination by Capillary Liquid Chromatography and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 73(13):3006–3010
- Wiseman DA, Sharma S, Black SM (2010) Elevated zinc induces endothelial apoptosis via disruption of glutathione metabolism: role of the ADP translocator. *Biometals* 23(1):19–30
- Yamaki S, Isobe T, Okuyama T, Shinoda T (1996) High-performance liquid chromatography of peptides on a microspherical carbon column. 19th International Symposium on Column Liquid Chromatography and Related Techniques 729(1–2):143–153
- Yin X, Li Y, Yan X (2008) CE-ICP-MS for studying interactions between metals and biomolecules. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 27(6):554–565

- Ynddal L, Hansen SH (2003) On-line turbulent-flow chromatography–high-performance liquid chromatography–mass spectrometry for fast sample preparation and quantitation. 19th Montreux Symposium on Liquid Chromatography - Mass Spectrometry, Supercritical Fluid Chromatography - Mass Spectrometry, Capillary Electrophoresis - Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry 1020(1):59–67
- Zhang Z, Guan S, Marshall AG (1997) Enhancement of the effective resolution of mass spectra of high-mass biomolecules by maximum entropy-based deconvolution to eliminate the isotopic natural abundance distribution. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 8(6):659–670
- Zhu P, Oe T, Blair IA (2008) Determination of cellular redox status by stable isotope dilution liquid chromatography/mass spectrometry analysis of glutathione and glutathione disulfide. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 22(4):432–440
- Zuern A, Salzer R, Thiele S (2007) *Grundlagen der Chromatographie*. Fachinformationszentrum Chemie GmbH, Berlin
- Zimmermann S, Sures B (2004) Significance of platinum group metals emitted from automobile exhaust gas converters for the biosphere. *Environ Sci Pollut Res Int* 11(3):194–199

## 7. Anhang

### SeMet-Massenspektrum

11081203 #141 RT: 1.06 AV: 1 SB: 374 0.11-0.80 , 1.57-3.69 NL: 3.64E7  
T: FTMS (1,1) + p ESI Full lock ms [100.00-1000.00]

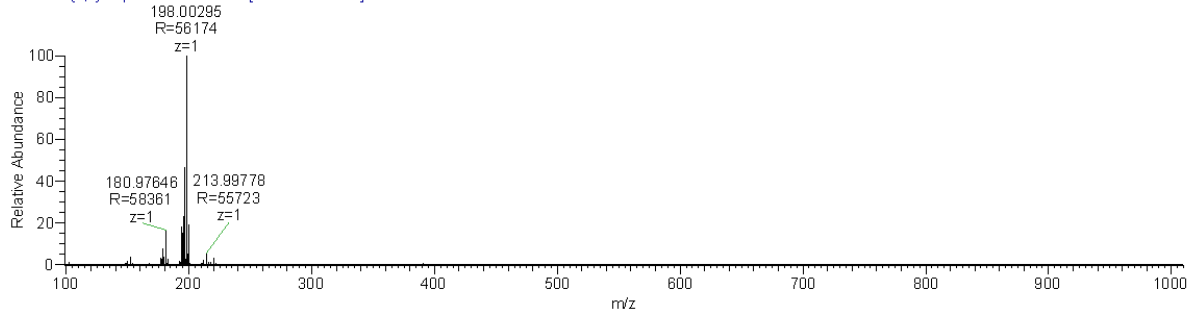


Abb. 67: SeMet Übersichtsspektrum.

Muschelernte an der Stever in Haltern am See, Nordrhein-Westfalen:

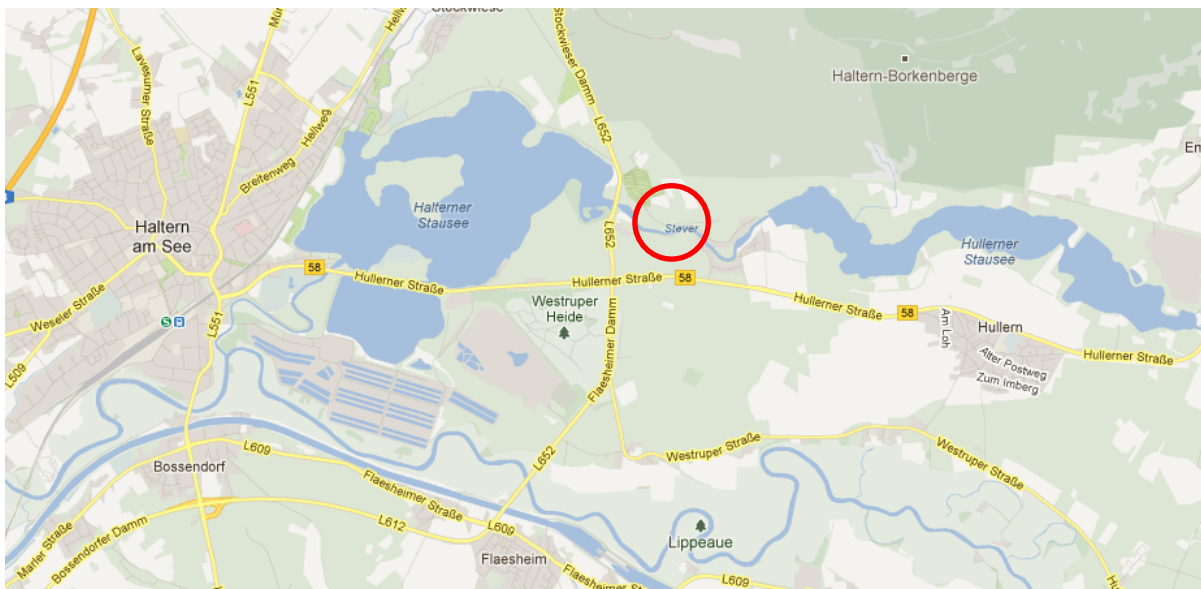
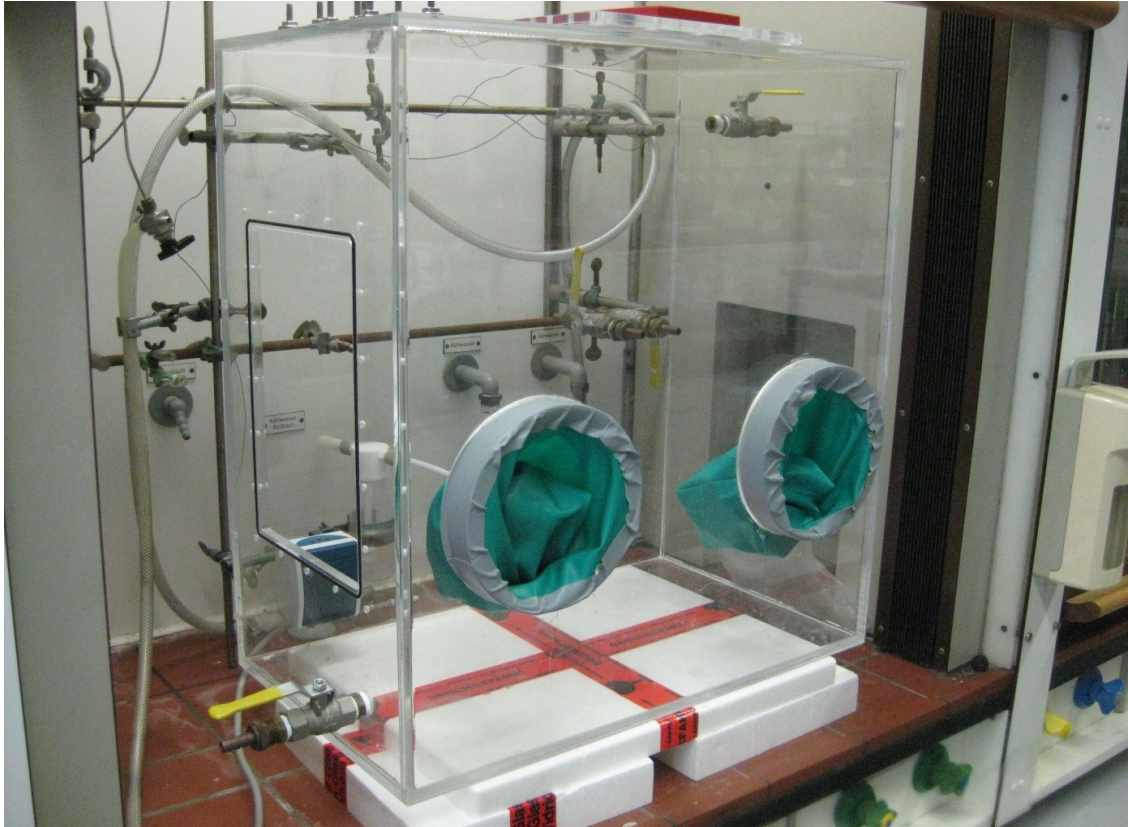
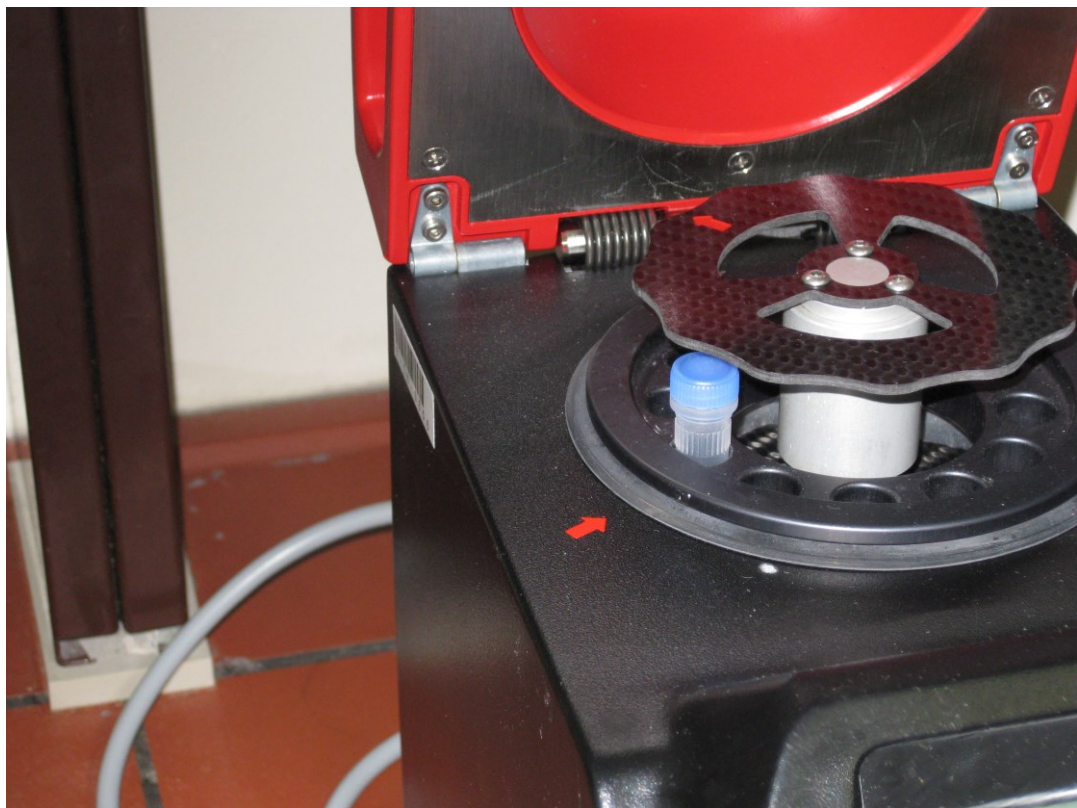


Abb. 68: Geographische Lage des Muschelernteplatzes an der Stever zwischen Halturner Stausee und Hullener Stausee im südlichen Münsterland [Karte aus GoogleMaps].



**Abb. 69: Glovebox zur Vermeidung von Oxidationen bei der Probenvorbereitung. Die Glovebox wurde in Anlehnung kommerziell erhältlicher Modelle entworfen und von den Werkstätten der Universität Duisburg-Essen gefertigt.**



**Abb. 70: SpeedMill zum Aufschluss des Gewebes.**





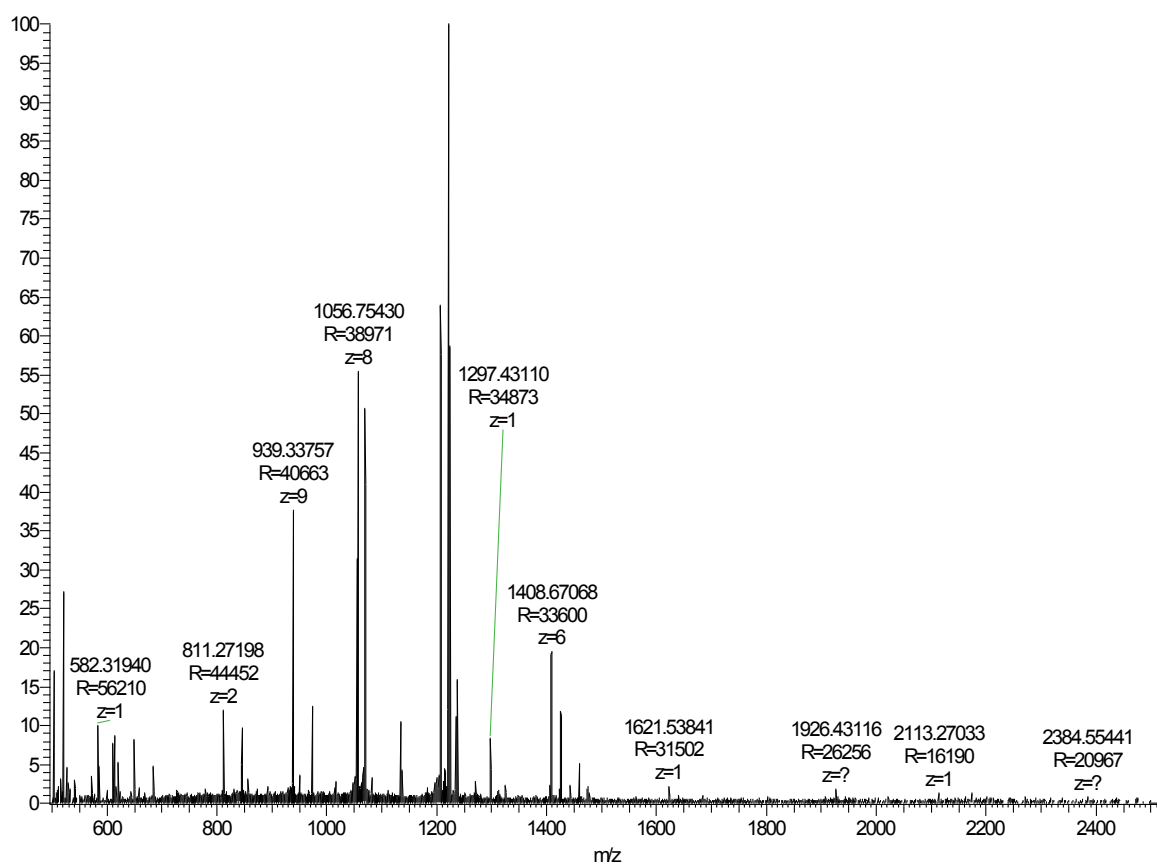
**Abb. 71: LysisTube zum Aufschluss von Gewebe. Im inneren des Gefäßes befinden sich Keramikugeln, die mechanisch das Gewebe verkleinern.**



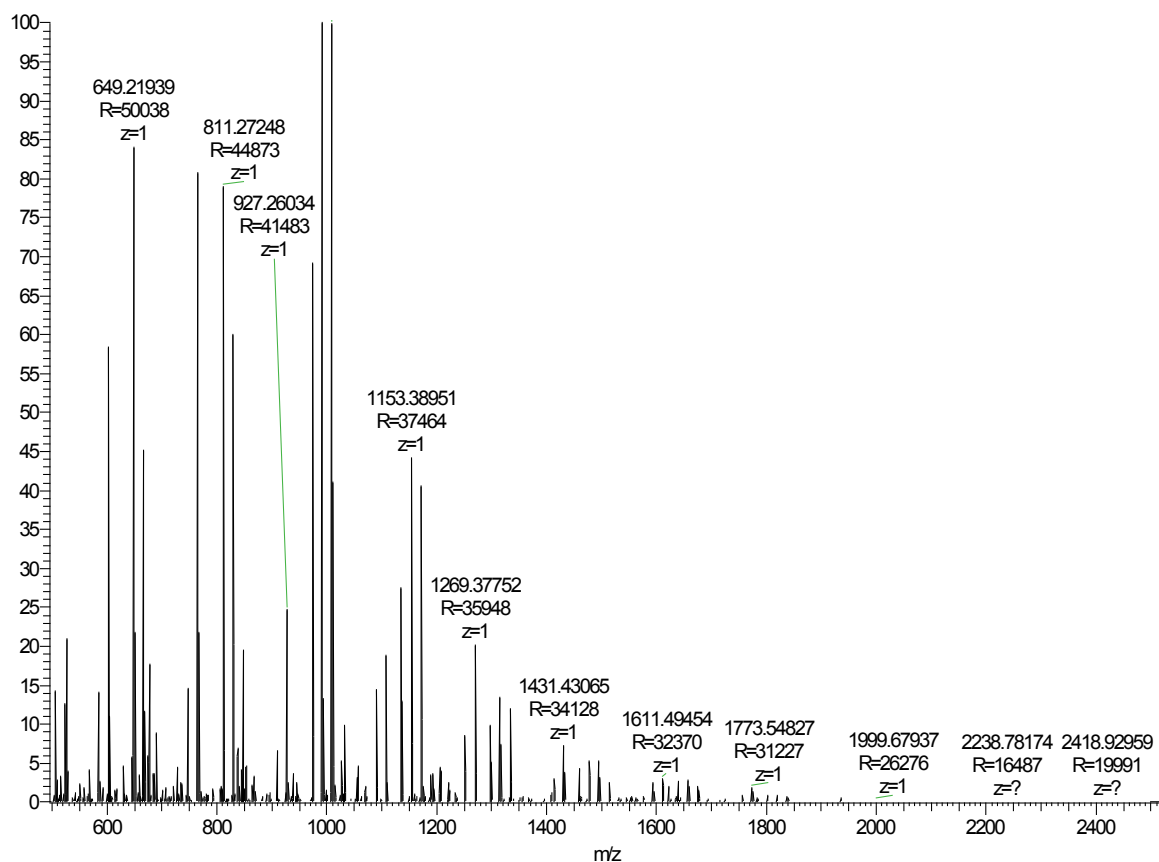
**Abb. 72: Anschluss der Desolvatisierungseinheit an die Plasmafackel des ICP-MS (oben) und Komplettansicht der Kopplungsapparatur bestehend aus HPLC, ESI-MS und ICP-MS (unten).**

## Exemplarische Rohspektren der PGE Spezies:

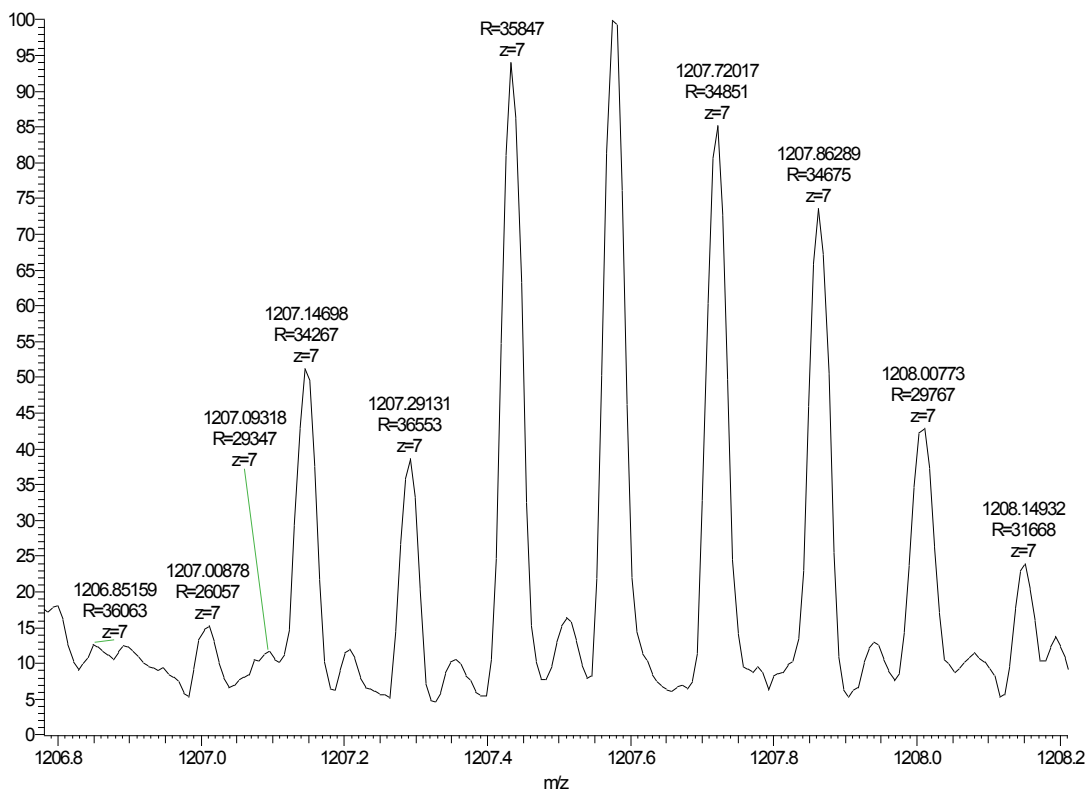
12061303 #509-587 RT: 6.99-8.06 AV: 79 NL: 4.03E4  
T: FTMS {1,1} + p ESI Full ms [500.00-2500.00]



12061303 #615-694 RT: 8.45-9.53 AV: 80 NL: 3.36E5  
T: FTMS {1,1} + p ESI Full ms [500.00-2500.00]

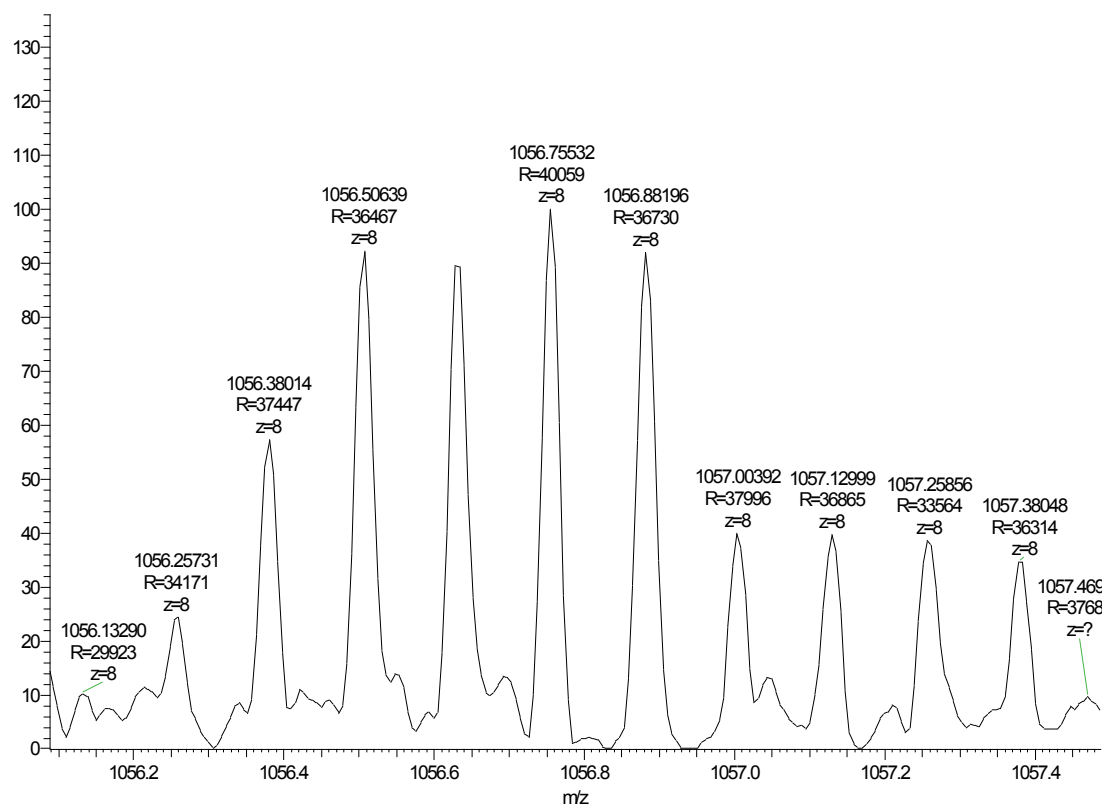


12061303 #899-1001 RT: 12.35-13.75 AV: 103 NL: 1.70E3  
T: FTMS {1,1} + p ESI Full ms [500.00-2500.00]

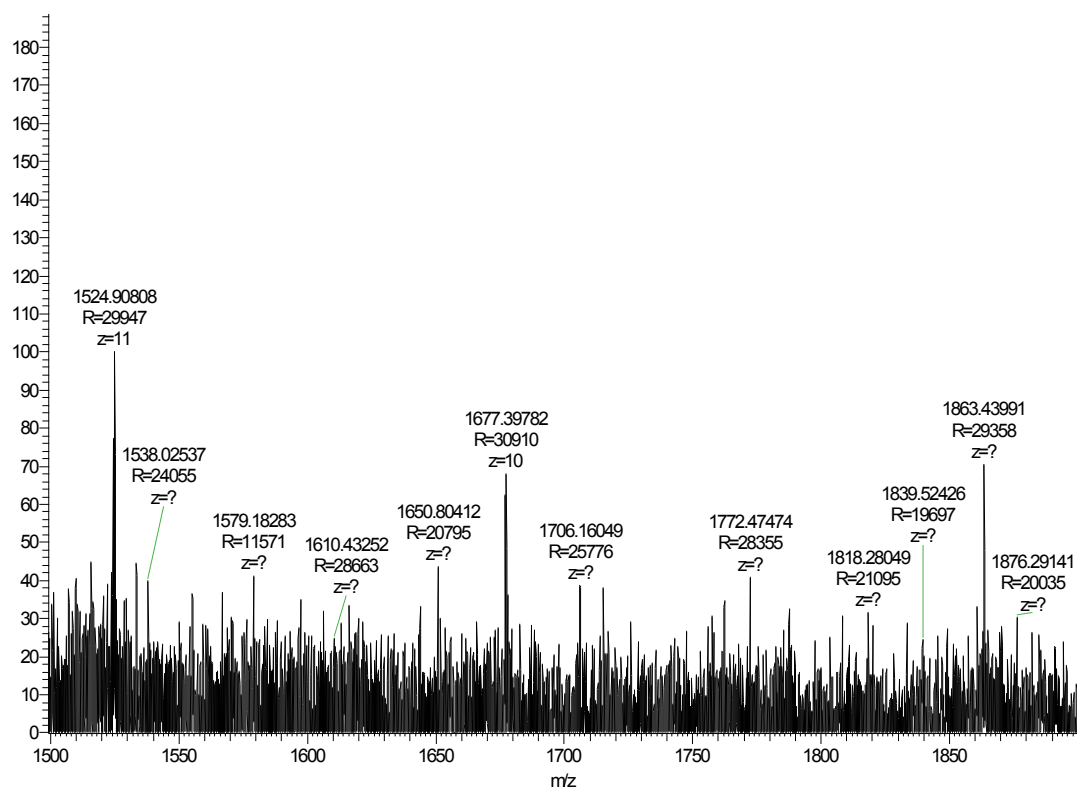




12061303 #842-872 RT: 11.57-11.98 AV: 31 NL: 4.19E3  
T: FTMS (1,1) + p ESI Full ms [500.00-2500.00]

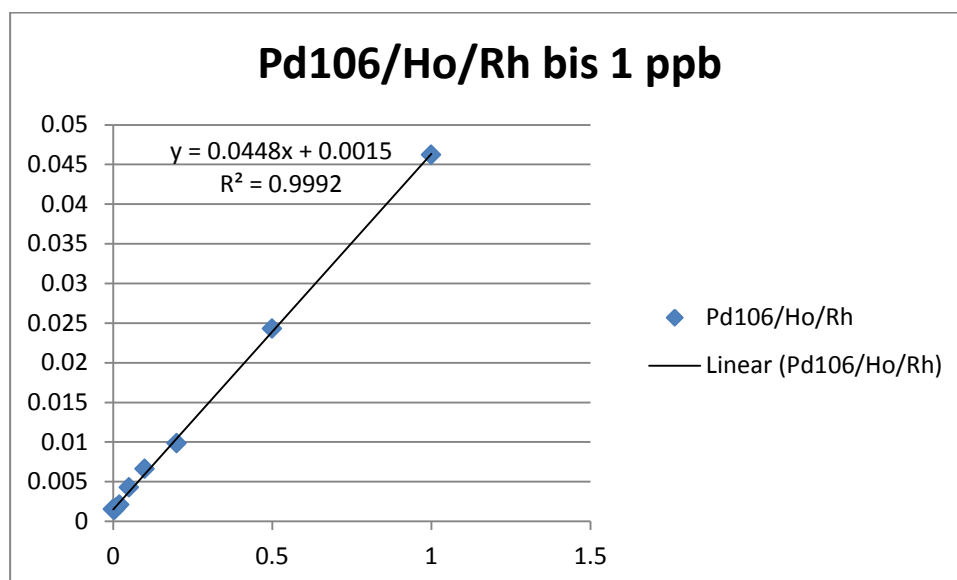


12061303 #885-973 RT: 12.16-13.37 AV: 89 NL: 7.39E2  
T: FTMS (1,1) + p ESI Full ms [500.00-2500.00]



## 7.1 Kenndaten der Kalibrationsgeraden

### 7.1.1 Kalibration von Pd106 auf Ho und Rh normiert als IS bis 1 ppb



#### Lineare Regression $f(x) = a \cdot x + b$

Steigung a

Achsenabschnitt b

Korrelationskoeffizient r

x-Mittelwert

Summe der Abweichungsquadrate vom Mittelwert

Residuen sind normalverteilt (R/s-Test, 99%)

Residuen haben einen Trend (Neumann-Test, 99%)

Max. Abweichung ist ein Ausreisser (F-Test, 99%)

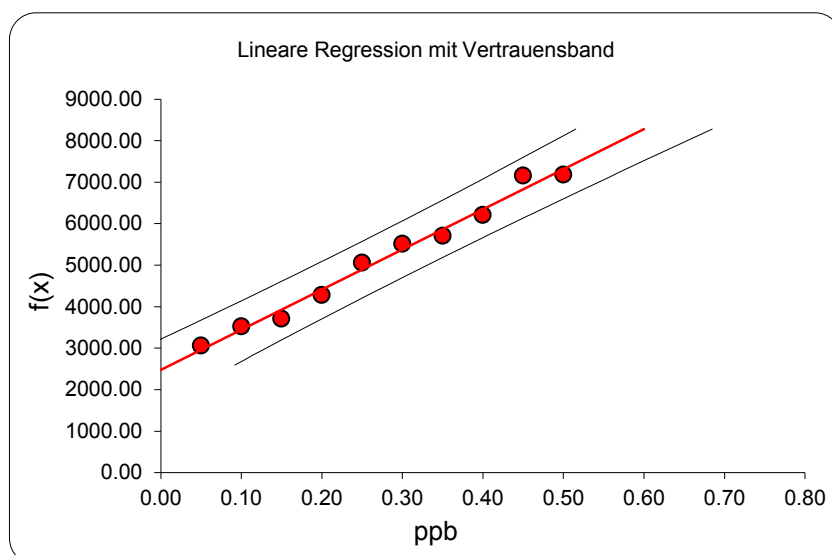
Reststandardabweichung Sy

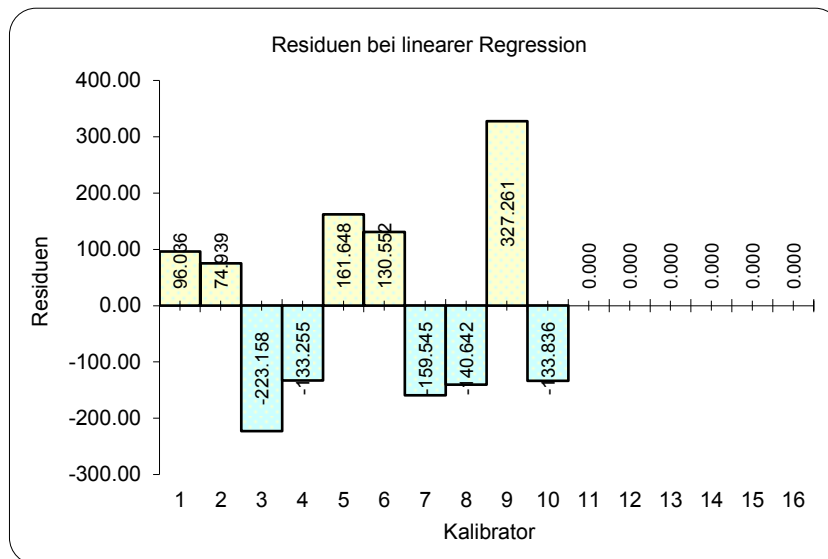
Verfahrensstandardabweichung Sx

Vertrauensbereich von Steigung a

Vertrauensbereich von Achsenabschnitt b

0,045	±	0,000
0,001	±	0,000
0,9996		
0,209		
0,908		
nein		PW=2,78 KW=13,74
0,000		
0,010		
0,043	bis	0,047
0,001	bis	0,002





### F-Test nach Mandel

optimales Regressionsmodell ?  
lineare Regression vertretbar ?

linear
ja

PW=0,22  
KW=13,74

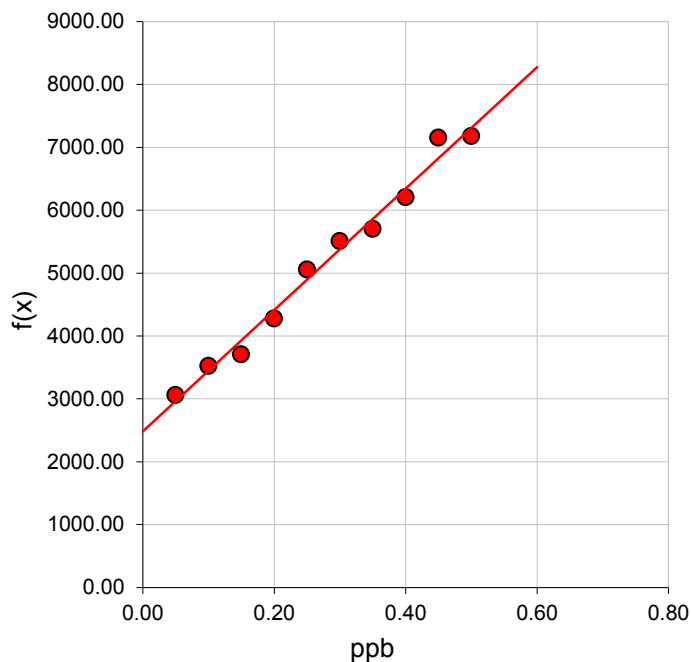
## Bericht

### Durchführung

Rohdaten	Pd106_kalib_1ppb
Messdatum	
Operator	MH
Analyt	Pd, Pt
Matrix	aufgeschlossenes Muschelweichgewebe und CRM
Analysengerät	ICP-MS mit TMD und CRC
Bemerkungen	

### Kalibrationspunkte

Kalibrator		Messwert
Nr.	ppb	counts
1	0,00	0,001519
2	0,005	0,001455
3	0,01	0,001721
4	0,02	0,002099
5	0,05	0,004253
6	0,10	0,00661
7	0,20	0,009832
8	0,50	0,024296
9	1,00	0,046191
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		



### Kenndaten

Steigung a	0,045
Achsenabschnitt b	0,001
Korrelationskoeffizient r	0,9996
Ergebnisunsicherheit	33,33 %
Irrtumswahrscheinlichkeit	1,00 %

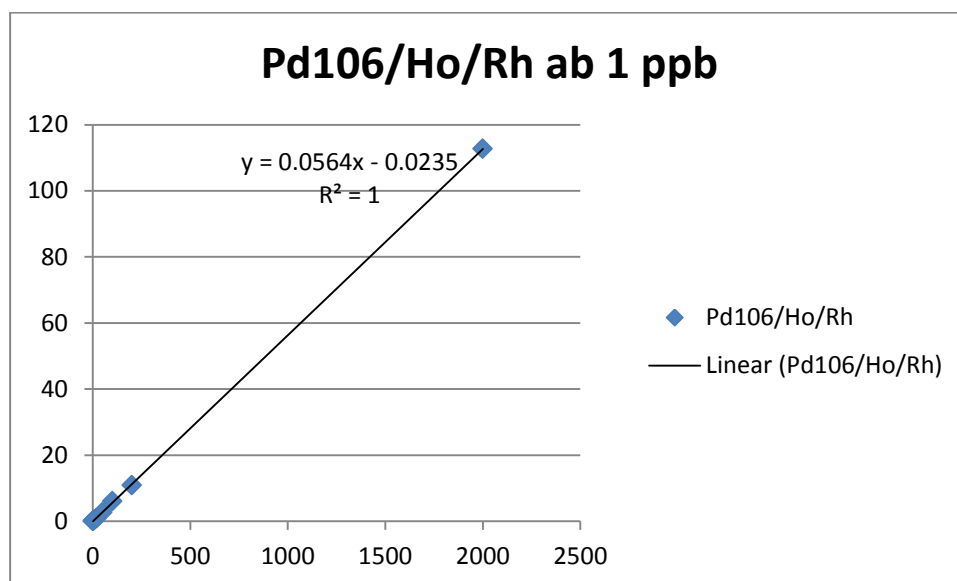
Anzahl der Messungen n  
 Reststandardabweichung  $S_y$   
 Verfahrensstandardabweichung  $S_x$   
 Summe der Abweichungsquadrate  
 Quantile (einseitig)  
 Quantile (zweiseitig)

5
0,000
0,010
0,908
2,998
3,499

### Analytische Grenzwerte nach DIN 32645

Nachweisgrenze	0,018	ppb	
Erfassungsgrenze	0,036	ppb	
Bestimmungsgrenze	0,062	ppb	(Näherung)
	0,061	ppb	(exakt)

## 7.1.2 Kalibration von Pd106 auf Ho und Rh normiert als IS ab 1 ppb



### Linearitätstest

Lineare Regression  $f(x) = a \cdot x + b$

Steigung a

Achsenabschnitt b

Korrelationskoeffizient r

x-Mittelwert

Summe der Abweichungsquadrate vom Mittelwert

Residuen sind normalverteilt (R/s-Test, 99%)

Residuen haben einen Trend (Neumann-Test, 99%)

Max. Abweichung ist ein Ausreißer (F-Test, 99%)

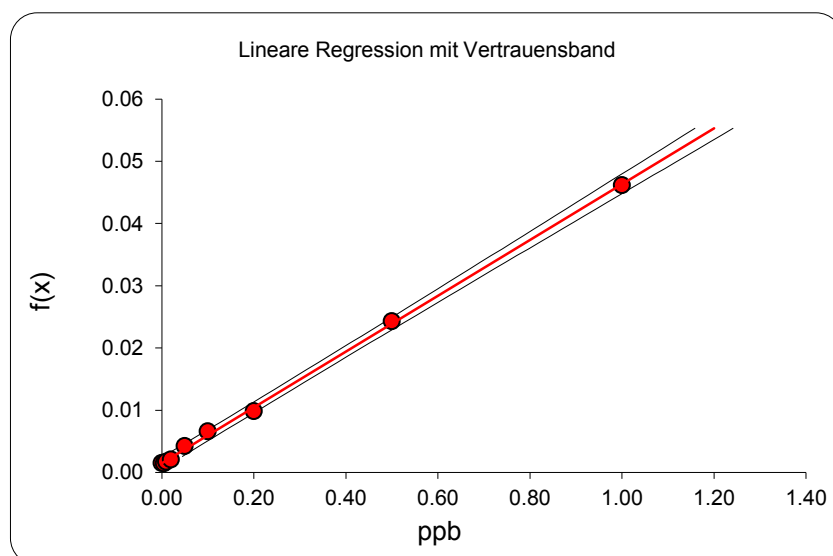
Reststandardabweichung Sy

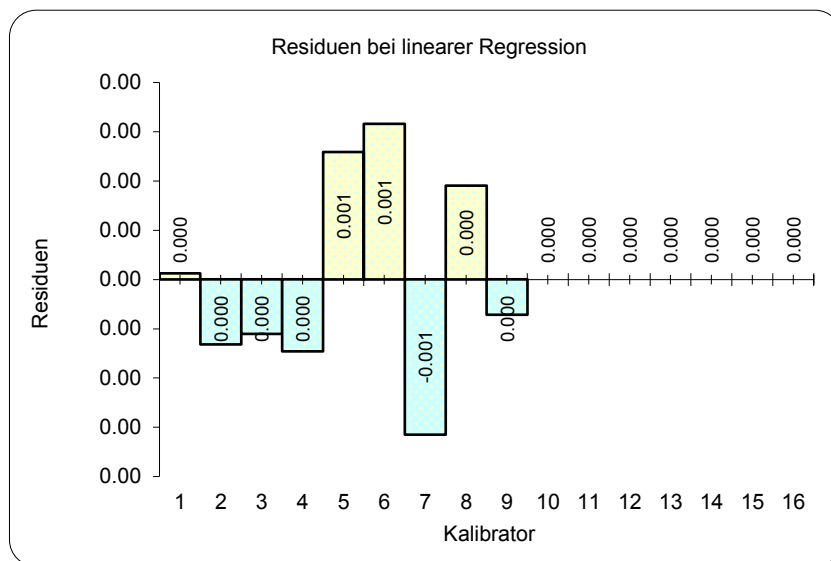
Verfahrensstandardabweichung Sx

Vertrauensbereich von Steigung a

Vertrauensbereich von Achsenabschnitt b

0,056	±	0,000
-0,024	±	0,077
1,0000		
265,333		
3419414,000		
ja		PW=3,67 KW=2,44 - 3,72
nein		PW=2,89 KW=0,7
nein		PW=12,49 KW=13,74
0,212		
3,754		
0,056	bis	0,057
-0,292	bis	0,245





### F-Test nach Mandel

optimales Regressionsmodell ?

lineare Regression vertretbar ?

linear
ja

PW=0,22 KW=13,74

## Bericht

1

### Durchführung

Rohdaten

Messdatum

Operator

Analyt

Matrix

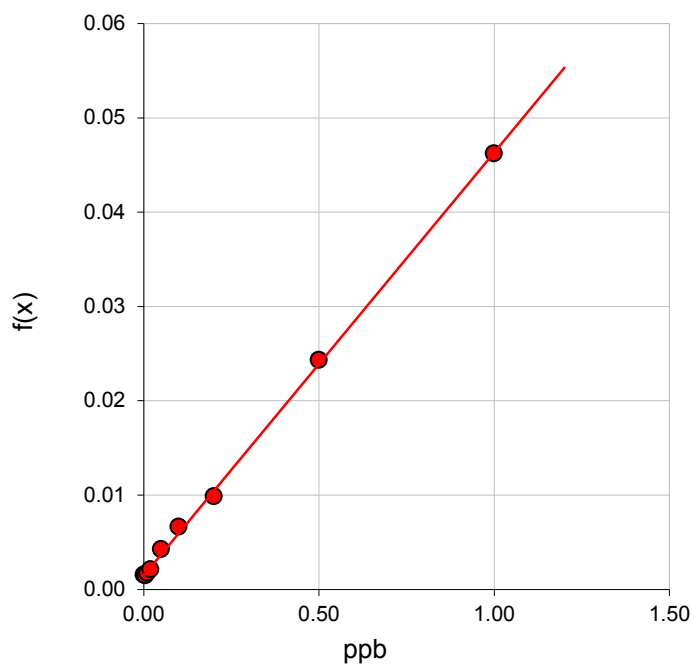
Analysengerät

Bemerkungen

Pd_kalib_2ppb
MH
Pd, Pt
aufgeschlossenes Muschelweichgewebe und CRM
ICP-MS mit TMD und CRC

**Kalibrationspunkte**

Kalibrator		Messwert
Nr.	ppb	counts
1	1,00	0,046191
2	2,00	0,152843
3	5,00	0,298132
4	10,00	0,516146
5	20,00	0,926722
6	50,00	2,727163
7	100,00	6,045371
8	200,00	10,9599
9	1000,00	51,823081
10	2000,00	112,726896
11		
12		
13		
14		
15		
16		

**Kenndaten**

Steigung a	0,056	
Achsenabschnitt b	-0,024	
Korrelationskoeffizient r	1,0000	
Ergebnisunsicherheit	33,33	%
Irrtumswahrscheinlichkeit	1,00	%

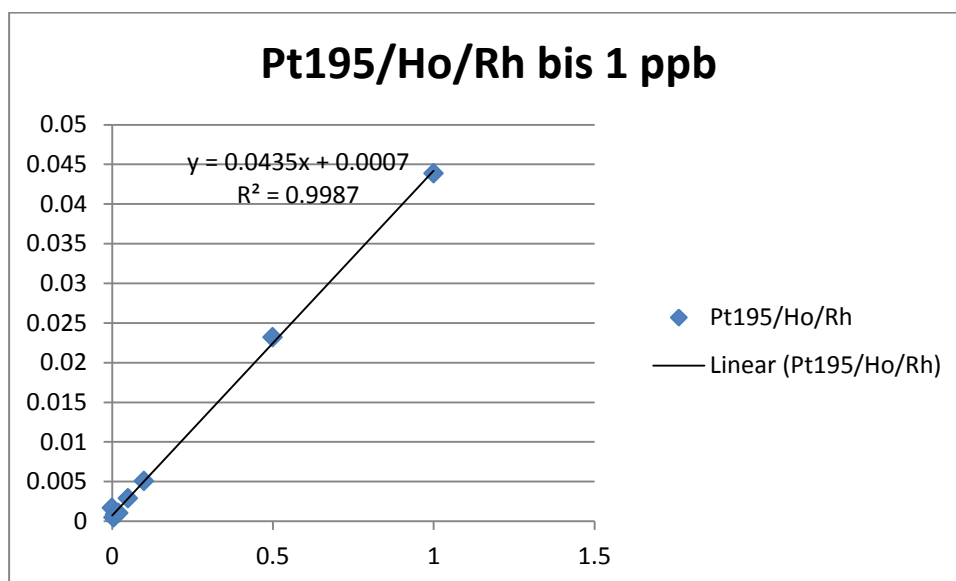
Anzahl der Messungen n  
 Reststandardabweichung  $S_y$   
 Verfahrensstandardabweichung  $S_x$   
 Summe der Abweichungsquadrate  
 Quantile (einseitig)  
 Quantile (zweiseitig)

5
0,212
3,754
3419414,000
2,998
3,499

**Analytische Grenzwerte nach DIN 32645**

Nachweisgrenze	6,482	ppb	
Erfassungsgrenze	12,963	ppb	
Bestimmungsgrenze	22,598	ppb	(Näherung)
	22,583	ppb	(exakt)

### 7.1.3 Kalibration von Pt195 auf Ho und Rh normiert als IS bis 1 ppb



### Linearitätstest

**Lineare Regression  $f(x) = a \cdot x + b$**

Steigung a

Achsenabschnitt b

Korrelationskoeffizient r

x-Mittelwert

Summe der Abweichungsquadrate vom Mittelwert

Residuen sind normalverteilt (R/s-Test, 99%)

Residuen haben einen Trend (Neumann-Test, 99%)

Max. Abweichung ist ein Ausreißer (F-Test, 99%)

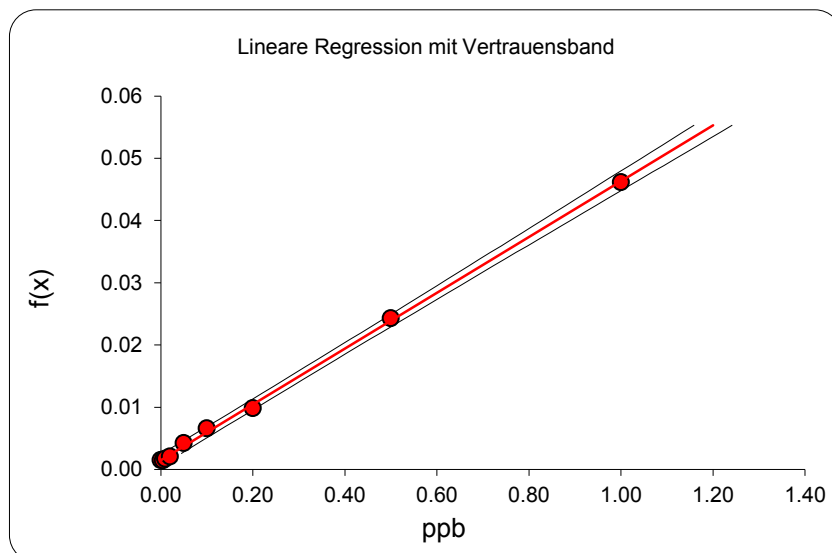
Reststandardabweichung Sy

Verfahrensstandardabweichung Sx

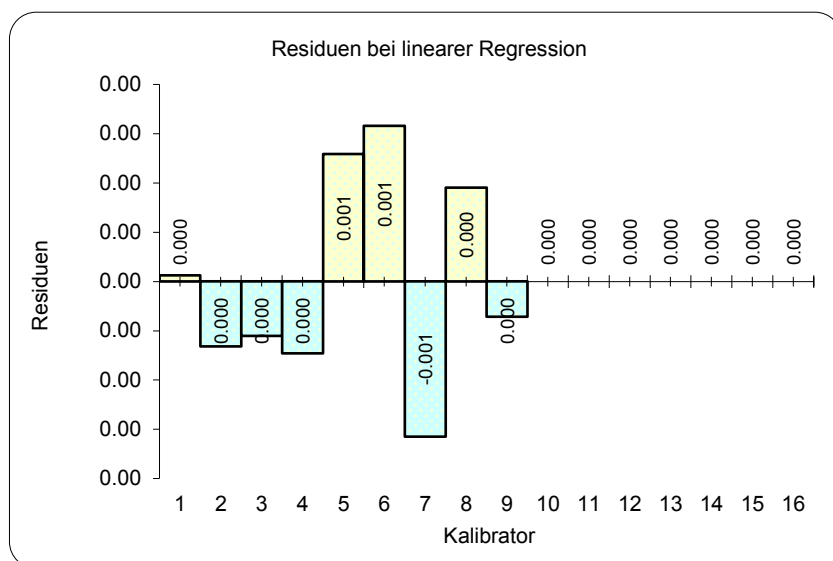
Vertrauensbereich von Steigung a

Vertrauensbereich von Achsenabschnitt b

0,043	±	0,001
0,001	±	0,000
0,9994		
0,211		
0,908		
nein		PW=4,97 KW=16,25
0,001		
0,014		
0,041	bis	0,046
0,000	bis	0,002







### F-Test nach Mandel

optimales Regressionsmodell ?

lineare Regression vertretbar ?

linear
ja

PW=1,31 KW=16,25

## Bericht

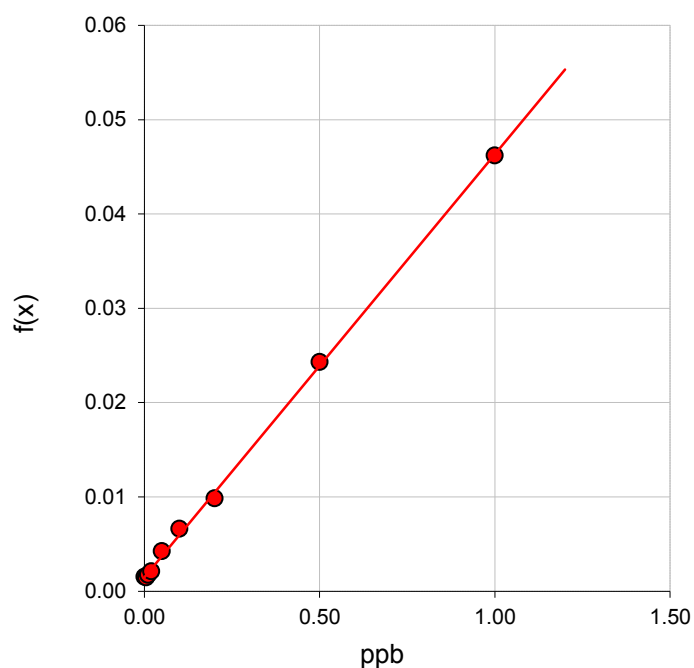
1

### Durchführung

Rohdaten	Pt195_kalib_1ppb
Messdatum	
Operator	MH
Analyt	Pd, Pt
Matrix	aufgeschlossenes Muschelweichgewebe und CRM
Analysengerät	ICP-MS mit TMD und CRC

### Kalibrationspunkte

Kalibrator		Messwert
Nr.	ppb	counts
1	0,00	0,001675
2	0,005	0,000479
3	0,01	0,000893
4	0,02	0,001022
5	0,05	0,002909
6	0,10	0,005091
7	0,20	0,013202
8	0,50	0,0232
9	1,00	0,043889
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		



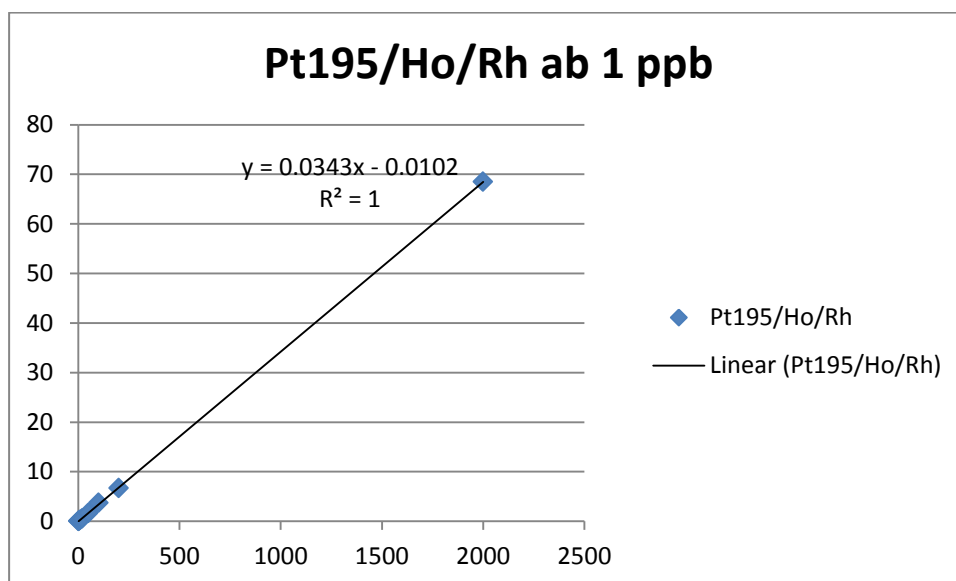
### Kenndaten

Steigung a	0,043	Anzahl der Messungen n	5
Achsenabschnitt b	0,001	Reststandardabweichung Sy	0,001
Korrelationskoeffizient r	0,9994	Verfahrensstandardabweichung Sx	0,014
Ergebnisunsicherheit	33,33 %	Summe der Abweichungsquadrate	0,908
Irrtumswahrscheinlichkeit	1,00 %	Quantile (einseitig)	3,143
		Quantile (zweiseitig)	3,707

### Analytische Grenzwerte nach DIN 32645

Nachweisgrenze	0,026	ppb	
Erfassungsgrenze	0,053	ppb	
Bestimmungsgrenze	0,090	ppb	(Näherung)
	0,090	ppb	(exakt)

### 7.1.4 Kalibration von Pt195 auf Ho und Rh normiert als IS ab 1 ppb



#### Linearitätstest

18.6.12 22:58

**Lineare Regression  $f(x) = a \cdot x + b$**

Steigung a

Achsenabschnitt b

Korrelationskoeffizient r

x-Mittelwert

Summe der Abweichungsquadrate vom Mittelwert

Residuen sind normalverteilt (R/s-Test, 99%)

Residuen haben einen Trend (Neumann-Test, 99%)

Max. Abweichung ist ein Ausreißer (F-Test, 99%)

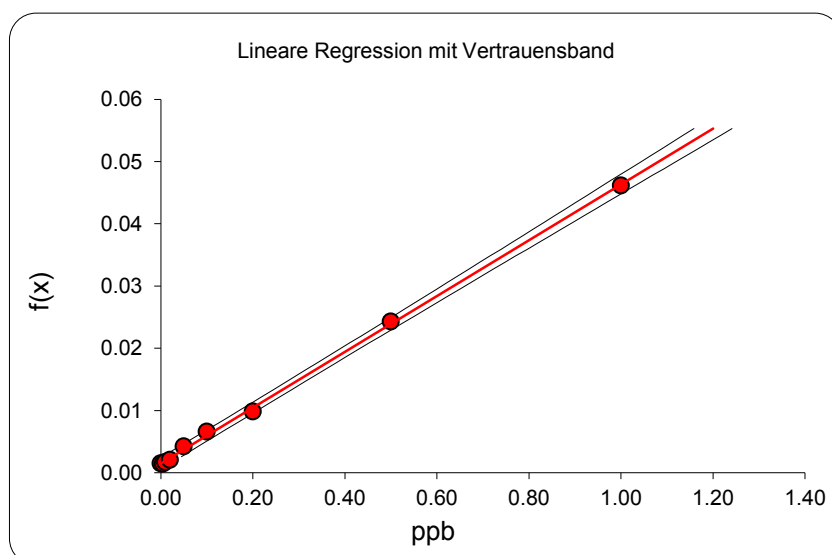
Reststandardabweichung Sy

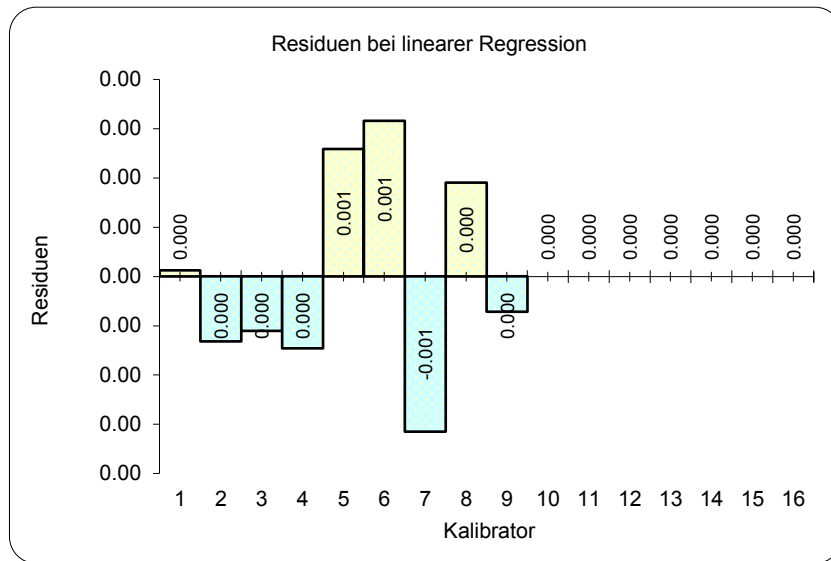
Verfahrensstandardabweichung Sx

Vertrauensbereich von Steigung a

Vertrauensbereich von Achsenabschnitt b

0,034	±	0,000
-0,010	±	0,051
1,0000		
265,333		
3419414,000		
ja		PW=3,43 KW=2,44 - 3,72
nein		PW=2,78 KW=0,7
ja		PW=26,78 KW=13,74
0,139		
4,070		
0,034	bis	0,035
-0,187	bis	0,167


☐  
☐



### F-Test nach Mandel

optimales Regressionsmodell ?

lineare Regression vertretbar ?

linear
ja

PW=0 KW=13,74

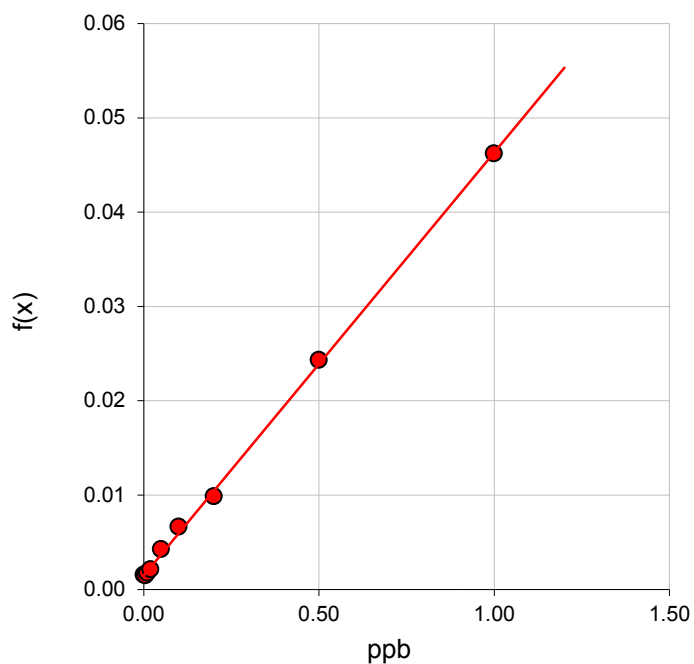
## Bericht

### Durchführung

Rohdaten	Pt195_kalib_2ppb
Messdatum	
Operator	MH
Analyt	Pd, Pt
Matrix	aufgeschlossenes Muschelweichgewebe und CRM
Analysengerät	ICP-MS mit TMD und CRC
Bemerkungen	

**Kalibrationspunkte**

Kalibrator		Messwert
Nr.	ppb	counts
1	1,00	0,043889
2	2,00	0,06599
3	5,00	0,173794
4	10,00	0,302056
5	20,00	0,558621
6	50,00	1,626892
7	100,00	3,727726
8	200,00	6,70796
9	1000,00	31,587955
10	2000,00	68,491304
11		
12		
13		
14		
15		
16		

**Kenndaten**

Steigung a	0,034	
Achsenabschnitt b	-0,010	
Korrelationskoeffizient r	1,0000	
Ergebnisunsicherheit	33,33	%
Irrtumswahrscheinlichkeit	1,00	%

Anzahl der Messungen n  
 Reststandardabweichung  $S_y$   
 Verfahrensstandardabweichung  $S_x$   
 Summe der Abweichungsquadrate  
 Quantile (einseitig)  
 Quantile (zweiseitig)

5
0,139
4,070
3419414,000
2,998
3,499

**Analytische Grenzwerte nach DIN 32645**

Nachweisgrenze	7,027	ppb	
Erfassungsgrenze	14,054	ppb	
Bestimmungsgrenze	24,492	ppb	(Näherung)
	24,474	ppb	(exakt)

## CERTIFIED REFERENCE MATERIAL BCR<sup>®</sup> – 723

### CERTIFICATE OF ANALYSIS

ROAD DUST			
Element	Mass fraction based on dry mass		Number of accepted sets of results p
	Certified value <sup>1)</sup> [µg/kg]	Uncertainty <sup>2)</sup> [µg/kg]	
Palladium	6.1	1.9	8
Platinum	81.3	2.5	16
Rhodium	12.8	1.3	9
<sup>1)</sup> Mean of accepted data set means each calculated from six replicates on dry basis and also corrected for recovery. The certified values are traceable to the Internal System of Units (SI). <sup>2)</sup> The uncertainty is taken as the half-width of the 95 % confidence interval of the mean given in 1).			

This certificate is valid for one year after purchase.

Sales date:

The minimum amount of sample to be used is 100 mg.

Indicative Values					
Element	Mass fraction based on dry mass			Number of accepted sets of data p	
	Indicative value <sup>1)</sup>		Uncertainty <sup>2)</sup>		
Al	3.75	%	0.22	%	3
Ba	0.46	g/kg	0.04	g/kg	5
Cd	2.5	mg/kg	0.4	mg/kg	5
Co	29.8	mg/kg	1.6	mg/kg	5
Cr	440	mg/kg	18	mg/kg	6
Fe	3.29	%	0.20	%	6
Hf	2.2	mg/kg	0.7	mg/kg	6
Mn	1.28	g/kg	0.04	g/kg	5
Mo	40.0	mg/kg	0.6	mg/kg	4
Ni	171	mg/kg	3	mg/kg	4
Pb	866	mg/kg	16	mg/kg	5
Rb	75	mg/kg	5	mg/kg	6
Sb	28.2	mg/kg	2.3	mg/kg	5
Sr	254	mg/kg	19	mg/kg	6
Ti	2.58	g/kg	0.13	g/kg	4
Th	4.8	mg/kg	0.5	mg/kg	3
V	74.9	mg/kg	1.9	mg/kg	3
Y	12.5	mg/kg	1.8	mg/kg	4
Zn	1.66	g/kg	0.10	g/kg	6

<sup>1)</sup> Mean value of p accepted data sets. The values are traceable to the Internal System of Units (SI).

<sup>2)</sup> The uncertainty is taken as the standard deviation of the values used to calculate the indicative value.

Abb. 73: Analysenzertifikat des zertifizierten Referenzmaterials BCR - 723

## 7.2 Abkürzungsverzeichnis

(k)Da	(kilo)Dalton
AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
amu	atomic mass unit (dt. atomare Masseneinheit)
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Arbitrary Unit (dt. willkürliche Einheit)
ca.	circa
CRM	Certified Reference Material (dt. zertifiziertes Referenzmaterial)
CSV	Comma Separated Values
d. h.	das heißt
dt.	deutsch
El	Elektronenstoß-Ionisation
eng.	englisch
ESI	Elektrospray Ionisation
FA	Formic Acid (dt. Ameisensäure)
frz.	französisch
FT	Fourier-Transform
GC	Gas Chromatography (dt. Gaschromatographie)
GSH	Glutathion
GshA	$\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase
GSSG	Oxidiertes Glutathion
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (dt. Hochleistungsflüssigchromatographie)
ICP	Induktively coupled Plasma (dt. Induktiv gekoppeltes Plasma)
IEM	Ionenemissionsmodell
IgG	$\gamma$ -Immunglobulin
IL	Interleukin
IR	Infrarot
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry

LC	Liquid Chromatography (dt. Flüssigchromatographie)
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital (dt. niedrigstes, unbesetztes Molekülorbital)
m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
MALDI	Matrix assisted Laserdesorption/Ionization (dt. Matrixunterstützte Laserdesorption und Ionisation)
MaxEnt	Maximale Entropie
mRNA	messenger ribonucleic acid (dt. Boten-Ribonukleinsäure)
MS	Massenspektrometrie
MT	Metallothionein
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (dt. Kernresonanz)
NWG	Nachweisgrenze
o.g.	oben genannt
OES	optische Emissionsspektroskopie
PDA	Photodioden Array
PFA	Perfluoralkoxy-Polymere
PFP	Pentafluorphenyl
PGC	Poröser graphitischer Kohlenstoff
PGE	Platingruppenelement
ppm	parts per million (dt. Teile pro Million)
ppb	parts per billion (dt. Teile pro Milliarde)
rel.	relativ
RF	Radiofrequenz
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SEC	Size Exclusion Chromatography (dt. Größenausschlusschromatographie)
SeMet	Selenomethionin
SH	Sulfhydryl-, Thiolgruppe
SOD	Superoxiddismutase
StaAbw	Standardabweichung
TFA	Trifluoracetat



TNF	Tumornekrosefaktor
TOF	Time of Flight (dt. Flugzeit)
t <sub>R</sub>	Retentionszeit
tRNA	transfer ribonucleic acid(dt. transfer Ribonukleinsäure)
u.a.	unter anderem
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
USGS	United States Geological Survey (Bundesbehörde der USA)
usw.	und so weiter
vgl.	vergleiche
z. B.	Zum Beispiel
ZIP	Zinktransporter (ins Zytosol)
ZNT	Zinktransporter (aus dem Zytosol)

## 7.3 Publikationsliste

### Referierte Publikationen

Bialek B, Diaz-Bone RA, Pieper D, Hollmann M, Hensel R (2011) Toxicity of Methylated Bismuth Compounds Produced by Intestinal Microorganisms to *Bacteroides thetaiotaomicron*, a Member of the Physiological Intestinal Microbiota. *J Toxicol*, 2011:608349.

Hollmann M, Boertz J, Dopp E, Hippler J, Hirner AV (2010) Parallel on-line Detection of a Methylbismuth Species by hyphenated GC/EI-MS/ICP-MS technique as evidence for Bismuth methylation by HepG2, *Metallomics*, 2, 52-56. (featured in Highlights in Chemical Biology 12,2009).

Hollmann M, Zimmer G, Boertz J, Hirner AV, Rettenmeier AW, Dopp E (2010) Nachweis der Biomethylierung von Bismut in humanen Leberzellen. *Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed*, 45, 349.

Boertz J, Hollmann M, Hippler J, Mosel F, Sulkowski M, Hirner AV, Rettenmeier AW (2009) Investigation of bismuth metabolism via mass spectrometric techniques. *Umweltmed Forsch Prax*, 14, 271-272.

Hippler J, Hollmann M, Boertz J, Hirner AV (2009) Synthesis and isolation of methyl bismuth cysteine and definitive identification by high resolution mass spectrometry. *Chem. Papers*, 63, 742-744.

Diaz-Bone RA, Hollmann M, Wuerfel O, Pieper D (2009) Analysis of volatile arsenic compounds formed by intestinal microorganisms: Rapid identification of new metabolic products by use of simultaneous EI-MS and ICP-MS detection after gas chromatographic separation. *J. Anal. At. Spectrom.* 24, 808-814.

### Sonstige Publikationen

Hollmann M (2010) Jede Metallspezies ist anders, *Nachrichten aus der Chemie*, 58, 1148-1150.

### Poster und Vorträge

Hollmann M (2012) Parallele Element- und Molekülmassenspektrometrie – Eine neues Werkzeug der Elementspeziation. Vortrag beim GDCh „Neujahrskolloquium 2012 in Essen

Hollmann M, Ruspic S, Hirner AV (2011) Trennung und Quantifizierung von oxidiertem und reduzierten Glutathion mittels LC/MS ohne vorherige Derivatisierung. Poster präsentiert auf der Anakon2011, 22.-25. März in Zürich, Schweiz

Hollmann M, Zimmer G, Boertz J, Hippler J, Hirner AV, Rettenmeier AW, Dopp E (2010) Nachweis der Biomethylierung von Bismut in humanen Leberzellen. Poster präsentiert auf der DGAUM-Conference 16.-19. Juni in Dortmund

Diaz-Bone RA, Hollmann M, Wuerfel O, Pieper D (2009) Analysis of volatile arsenic compounds formed by intestinal microorganisms: rapid identification of new metabolic products by use of simultaneous EI-MS and ICP-MS detection after gas chromatographic separation. Poster präsentiert auf der TraceSpec 2009, 15.-18. September in Mainz

Riesop D, Hollmann M, Hirner AV (2009) Interaction of bismuth cysteine complexes with plasma proteins. Poster präsentiert auf dem "International JCF-Spring symposium", 11. – 13. März in Essen

Hollmann M, Hippler J, Riesop D, Hirner AV (2009) Investigation of Bismuth-Metabolism by Mass Spectrometry. Vortrag auf dem "International JCF-Spring symposium", 11. – 13. März in Essen

Boertz, J, Hollmann, M, Hippler, J, Mosel, F, Sulkowski, M, Hartmann, L, Hirner, AV, Rettenmeier, AW (2009) "Investigation of Bismuth metabolism via mass spectrometric techniques" 3. Jahrestagung der Gesellschaft für Hygiene, Umwelt- und Präventivmedizin, 8.-10. Oktober in Stuttgart

Hippler J, Hollmann M, Boertz J, Hirner AV (2008) Synthesis, Isolation, Identification and Derivatisation of Monomethyl Bismuth Cysteine. Poster präsentiert auf der „International Conference on Trace Element Speciation“, 21.-24. April in München

## 7.4 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

## 7.5 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

*„Elementspeziesanalytik von Palladium, Platin und Zink mittels simultaner ESI-MS und ICP-MS Detektion nach flüssigchromatographischer Trennung“*

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Maxdorf, im Juni 2013

## 7.6 Danksagung

Zu allererst möchte ich meiner Frau Yvonne und dem Rest meiner Familie danken, die mich auf diesem langen Weg begleitet und gleichzeitig für Motivation und Zerstreuung gesorgt hat.

Ein riesiges Dankeschön an Prof. Hirner, der mir als einem seiner letzten Doktoranden die Möglichkeit zur Promotion eröffnet und mir die Möglichkeit gegeben hat mich frei mit den Fragestellungen auseinander zu setzen und zu einem Wissenschaftler zu entwickeln. Seine Begeisterung für ein Thema ist ansteckend und mitreißend zugleich.

Vielen Dank auch an Prof. Sures der nicht nur das Koreferat übernommen, sondern mich auch bei der Suche nach einer Postdoc-Stelle unterstützt hat.

Ebenso möchte ich meinen Kollegen aus dem AK-Hirner danken:

Maria, die immer als gute Seele des Instituts dafür gesorgt hat, dass die vielen unauffälligen aber wichtigen „Kleinigkeiten“ wie Abluft, Kühlwasser uvm. funktionieren oder ausreichend Chemikalien und Verbrauchsmaterial zur Verfügung stehen.

Jörg, der immer versucht hat zu helfen, wo es ihm möglich war und besonders bei technischen Problemen durch „Handauflegen“ das ein oder andere Gerät „wiedererweckt“ hat.

Birgit, der es immer gelungen ist eine ordnende Hand im Chaos darzustellen und uns bei den oftmals ungeliebten „Lehraufgaben“ zu unterstützen.

Besonderen Dank auch an David, der mich nicht nur seit dem ersten Tag des Studiums begleitet hat, sondern zu einem echten Freund geworden ist, der bei fachlichen Diskussionen genauso brilliert, wie bei der Wahl seines Lieblingsvereins oder des leckersten Mittagessens. Vielen Dank auch an Max, Daniel und Sven, mit denen die Zusammenarbeit leider zu kurz war, aber mir stets Freude bereitete.

Ein großes Dankeschön auch an Klaudia, Pia, Kamil und Sepideh, die sich in meine Obhut getraut haben und mit Ihren Bachelor-, Master- und

Vertiefungsarbeiten einen wertvollen Beitrag zur Entstehung dieser Dissertationsschrift geleistet haben.

Ebenfalls danke ich Bea, die mir bei den DNA-Experimenten immer gut gelaunt mit Rat und Tat zur Seite stand. Genauso möchte ich auch Nadine meinen Dank aussprechen für die unzähligen Erklärungen im Bereich der Hydrobiologie und die Versorgung mit allem möglichen Bildmaterial für Präsentationen, sowie der guten und fruchtbaren Zusammenarbeit im PGE-Projekt.